

# **Transgene Mausmodelle zur Charakterisierung der Funktion kardialer $\beta$ -adrenerger Rezeptoren**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Engelhardt

aus

München

Würzburg 2001

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....Prof. Dr. Erich Buchner.....

Gutachter : .....Prof. Dr. Martin Lohse.....

Gutachter: .....Prof. Dr. Martin Heisenberg.....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |            |
|---|------------|
| <b>EINLEITUNG</b> .....   | <b>3</b>   |
| SIGNALTRANSDUKTION G-PROTEIN GEKOPPELTER REZEPTOREN.....  | 3          |
| $\beta$ -ADRENERGE REZEPTOREN UND IHRE FUNKTION AM HERZEN .....                                   | 5          |
| TRANSGENE TIERE ZUR UNTERSUCHUNG KARDIAL EXPRIMIERTER GENE IN VIVO.....                           | 11         |
| ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....  | 13         |
| <b>METHODEN</b> .....   | <b>15</b>  |
| MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....   | 15         |
| PROTEINANALYTISCHE METHODEN.....  | 24         |
| GENERIERUNG TRANSGENER TIERE .....  | 25         |
| PHYSIOLOGISCHE METHODEN.....  | 28         |
| HISTOLOGISCHE METHODEN.....   | 31         |
| <b>ERGEBNISSE</b> .....   | <b>33</b>  |
| GENERIERUNG UND INITIALE CHARAKTERISIERUNG $\beta_1$ -TRANSGENER MÄUSE.....                       | 33         |
| KONSTITUTIVE AKTIVITÄT DES ÜBEREXPRIMIERTEN REZEPTORS.....  | 39         |
| KARDIALE HYPERTROPHIE UND FIBROSE IN $\beta_1$ -TRANSGENEN MÄUSEN .....                           | 43         |
| $\beta_1$ -TRANSGENE MÄUSE ENTWICKELN EINE HERZINSUFFIZIENZ.....                                  | 46         |
| $\beta_1$ -TRANSGENE MÄUSE UND $\beta_2$ -TRANSGENE MÄUSE ZEIGEN UNTERSCHIEDLICHE PHÄNOTYPEN..... | 53         |
| SUCHE NACH DEN URSACHEN DER $\beta$ -ADRENERG INDUZIERTEN HYPERTROPHIE: CALCIUMHAUSHALT.....      | 59         |
| SUCHE NACH NEUEN KANDIDATENGENEN FÜR HERZHYPERTROPHIE UND –INSUFFIZIENZ.....                      | 64         |
| <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>72</b>  |
| DIE BEDEUTUNG DER $\beta_1$ -REZEPTORABNAHME FÜR DIE PATHOGENESE DER HERZINSUFFIZIENZ.....        | 72         |
| WARUM ZWEI VERSCHIEDENE $\beta$ -REZEPTORSUBTYPEN IM MYOKARD? .....                               | 75         |
| KONSTITUTIVE AKTIVITÄT DES $\beta_1$ -ADRENERGEN REZEPTORS.....                                   | 78         |
| ÜBER WELCHE MECHANISMEN FÜHRT $\beta$ -ADRENERGE STIMULATION ZU HERZHYPERTROPHIE?.....            | 81         |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>88</b>  |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCH</b> .....  | <b>90</b>  |
| <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>92</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>102</b> |
| <b>DANKSAGUNG</b> .....   | <b>103</b> |
| <b>LEBENS LAUF</b> .....  | <b>104</b> |

## **EINLEITUNG**

*The desire to take medicines.....distinguishes man from animals.*

*Sir William Osler*

### **Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren**

Das Überleben aller multizellulären Organismen setzt ein funktionierendes Informationsnetzwerk voraus, durch das Wachstum, Differenzierung und Metabolismus einzelner Zellen gesteuert werden. Außer beim direkten Zell-Zell-Kontakt benachbarter Zellen werden Informationen durch Botenstoffe über größere Distanzen vermittelt. Niedermolekulare Substanzen, Peptide und Proteine finden dabei als Botenstoffe Verwendung. Diese gelangen entweder durch lokale Diffusion zu ihrem Zielort (parakrin/autokrin) oder aber werden über den Blutkreislauf transportiert. Die Spezifität der Signalübertragung wird unter anderem dadurch gewährleistet, daß die Botenstoffe nur in solchen Zellen eine Antwort auslösen, die über spezifische Rezeptoren für einen bestimmten Botenstoff verfügen (Lodish et al., 2000).

Rezeptoren sind Proteine, die auf der Oberfläche einer Zelle oder in ihrem Inneren lokalisiert sind und eine Bindungsstelle z.B. für einen bestimmten Hormon oder eine Gruppe von Hormonen aufweisen. Die Bindungsstelle ist so beschaffen, daß nur bestimmte Botenstoffe hier binden können, andere haben keine Affinität zu dieser Bindungsstelle. Diese Bindung eines sog. Liganden führt dann zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die dann eine Kette intrazellulärer Reaktionen auslöst.

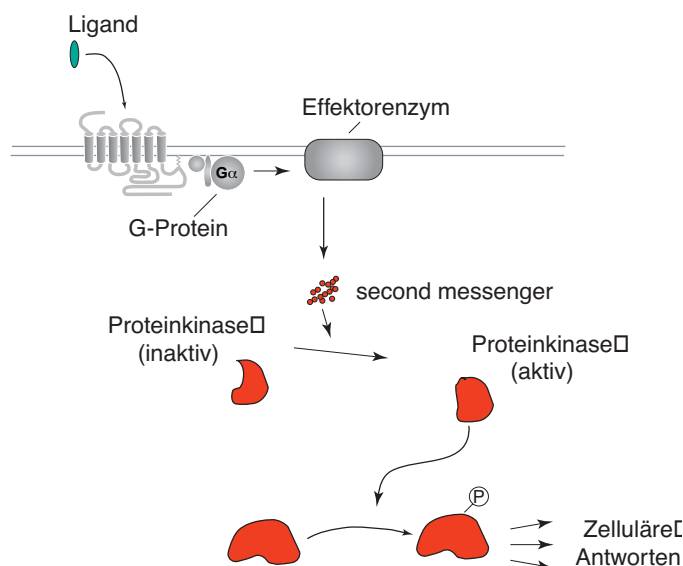
Rezeptoren können in 5 verschiedene Klassen eingeteilt werden, die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität, Tyrosinkinase-aktivierende Rezeptoren und nukleäre Rezeptoren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Das menschliche Genom enthält die kodierenden Sequenzen für 1500 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), von denen 1200 für Geruchs- oder Geschmacksrezeptoren kodieren (Mombaerts, 1999).

Unter den verbleibenden 300 offenen Leserahmen befinden sich 191 bekannte Rezeptoren, von denen gegenwärtig für 70 ein Ligand bekannt ist (Howard et al., 2001). Die übrigen 121 Rezeptoren werden als sog. Orphan Rezeptoren bezeichnet, für sie ist noch kein Ligand und meist noch keine Funktion im Organismus gefunden. Damit codieren etwa 5% des humanen Genoms für G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

50% der auf dem Markt befindlichen Medikamente wirken über die Aktivierung oder Blockade G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Howard et al., 2001).

Bei sehr ähnlicher Grundstruktur – alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren enthalten sieben die Zellmembran durchspannende Domänen – sind diese Rezeptoren in der Lage auf unterschiedlichste Stimuli zu reagieren und diese Informationen über ein G-Protein in das Zellinnere weiterzugeben. Die Bandbreite dieser Stimuli reicht dabei von niedermolekularen Hormonen (z.B. Acetylcholin) und Geruchsstoffen bis hin zu einzelnen Photonen die den Lichtrezeptor Rhodopsin aktivieren. Diese Botenstoffe führen durch Konformationsänderung des spezifischen Rezeptors zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine die dann intrazelluläre Effektorenzyme aktivieren oder Ionenkanäle modulieren. Abb. 1 gibt einen schematischen Überblick über die Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.



**Abb. 1. Schematische Darstellung der Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.** Die Bindung eines Botenstoffes an den Rezeptor führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die zur Phosphorylierung spezifischer Substratproteine führt. Diese vermitteln dann die spezifische Antwort der Zelle (mod. nach Lodish et al., 2000).

Diese Signalkaskade erlaubt dem Körper einerseits mit einer überschaubaren Anzahl von Proteinen eine Vielzahl möglicher Kombinationsmöglichkeiten. So bewirkt die Aktivierung  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren in vielen Zelltypen die Aktivierung der Proteinkinase A, während dies in anderen Zelltypen zur Aktivierung einer MAP-Kinase führt. Andererseits ermöglicht eine solche Signalkaskade eine enorme Verstärkung des Signals. So kann beispielsweise ein aktivierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren (Gross und Lohse, 1991), die dann zum Beispiel jeweils ein Molekül Adenylatzyklase aktivieren. Jedes einzelne aktivierte Molekül Adenylatzyklase katalysiert dann die Bildung einiger tausend Moleküle des Botenstoffes cAMP (Ross und Gilman, 1980; Tang und Gilman, 1992), der die Proteinkinase A aktiviert. Diese Kinase phosphoryliert nun eine Reihe von Zielproteinen (Francis und Corbin, 1994). Der Verstärkungsfaktor dieser Signalkaskade ist enorm und kann im Falle der Rhodopsin-aktivierung in der Retina eine Verstärkung um den Faktor  $10^6$  (Stryer, 1988) erreichen.

Der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor ist einer der am besten charakterisierten Rezeptoren überhaupt. Aufgrund seiner einfach zu bestimmenden Wirkung in physiologischen Systemen (z.B. Erschlaffung von Gefäßen und Kraftzunahme an Herzmuskelpräparaten) wurde dieser Rezeptor bereits sehr früh postuliert (Alquist, 1948) und bereits 1986 kloniert (Dixon et al., 1986). Inzwischen weiß man, daß dieser Rezeptor über drei Subtypen verfügt, die Mitglied einer Familie von insgesamt neun adrenergen Rezeptoren sind. Man unterscheidet  $\beta$ -,  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren mit jeweils 3 Subtypen:  $\beta_{1-3}$ ,  $\alpha_{1A-C}$  und  $\alpha_{2A-C}$ . Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren koppeln an stimulatorische G-Proteine,  $\alpha_1$ -Rezeptoren an Gq und  $\alpha_2$ -Rezeptoren an inhibitorische G-Proteine. In den letzten Jahren ist klar geworden, daß in einzelnen Zelltypen auch von dieser Regel abweichende G-Protein-Kopplungen möglich sind (siehe unten).

## **$\beta$ -Adrenerge Rezeptoren und ihre Funktion am Herzen**

Die Herzfunktion wird von einer Reihe neurohumoraler Mechanismen reguliert, die ihre Information zu einem großen Teil über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf die einzelne Zelle übertragen. Abhängig von ihrer Lokalisation auf bestimmten Zelltypen im Herzen und abhängig von ihrer Kopplung an intrazelluläre Signalwege kann die

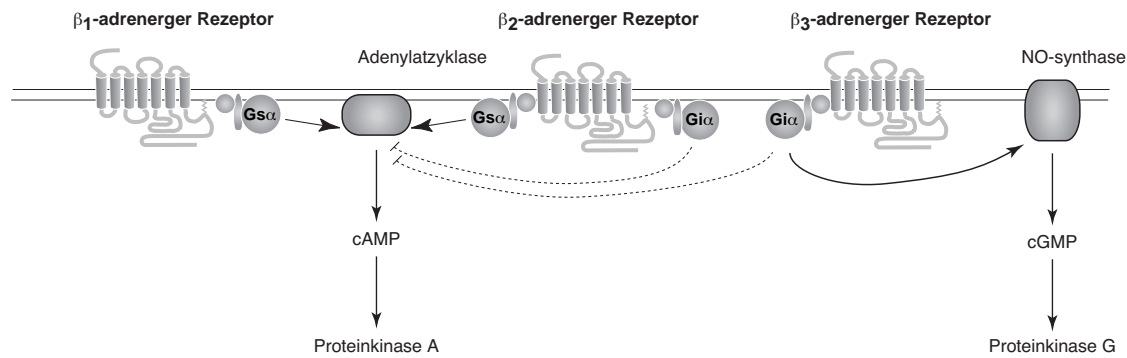
Aktivierung dieser Rezeptoren eine Vielzahl von Effekten bewirken, die von einer Steigerung der Schlagkraft bis hin zur vermehrten Bildung von Bindegewebe durch kardiale Fibroblasten reichen.

Im menschlichen Herz werden alle 3 bekannten Subtypen des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors exprimiert (Brodde und Michel, 1999). Funktionell dominiert am gesunden Herz der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor. Die Stimulation  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren stellt den stärksten Mechanismus dar, über den der menschliche Körper die Schlagkraft und die Frequenz des Herzens steigern kann (Brodde, 1993).  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren werden vor allem in Kardiomyozyten exprimiert. Die Aktivierung erfolgt zum überwiegenden Teil durch Noradrenalin, das aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt wird. Quantitativ von geringerer Bedeutung ist wahrscheinlich die Aktivierung durch aus dem Nebennierenmark freigesetztes Adrenalin.

Die Funktion des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors am Herzen ist weniger klar definiert. Der  $\beta_2$ -Subtyp wird neben Kardiomyozyten auch auf kardialen Fibroblasten und in der Wand von Gefäßen exprimiert. Aus experimentellen Studien ist klar, daß es hinsichtlich der inotropen Wirkung auf Kardiomyozyten eine funktionelle Redundanz mit dem  $\beta_1$ -Subtyp gibt (Brodde und Michel, 1999). Dieser relative Anteil der  $\beta_2$ -Rezeptoren an der Gesamtstimulation vergrößert sich jedoch erheblich in der Herzinsuffizienz, bei der der  $\beta_1$ -Subtyp herabreguliert wird (s.u.).

Der  $\beta_3$ -Subtyp wurde als letzter der 3 Subtypen kloniert (Emorine et al., 1989) und ist erst vor kurzem auch im Herzen entdeckt worden (Gauthier et al., 1996). Während die Expression im gesunden Herzen sehr gering zu sein scheint, kommt es im insuffizienten Herzen zu einem Anstieg der  $\beta_3$ -Rezeptordichte (Moniotte et al., 2001). Es gibt bislang keine Untersuchungen, die diesen Rezeptorsubtyp bestimmten Zelltypen zuordnen könnten. Adrenalin und Noradrenalin sind wahrscheinlich die natürlichen Liganden für diesen Subtyp.

Ging man bis vor kurzem davon aus, daß  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in Kardiomyozyten ausschließlich an stimulatorische G-proteine koppeln, so ist durch neuere Arbeiten klar, daß  $\beta_2$ -Rezeptoren in Kardiomyozyten neben der Kopplung an stimulatorische G-proteine auch an inhibitorische G-proteine koppeln können (Xiao et al., 1999).  $\beta_3$ -Adrenerge Rezeptoren koppeln wahrscheinlich über inhibitorische G-Proteine an den NO-Weg (Gauthier et al., 1998) (Abb 2).



**Abb 2. Kopplung der drei verschiedenen  $\beta$ -Rezeptorsubtypen an intrazelluläre Signalwege.**  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren koppeln in Kardiomyozyten an stimulatorische G-proteine (Gs) und aktivieren so die Adenylatzyklase.  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren koppeln zusätzlich an inhibitorische G-proteine (Gi) und hemmen so die Adenylatzyklase.  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptoren binden inhibitorische G-Proteine und erhöhen hierüber wahrscheinlich die Bildung von NO.

### Das $\beta$ -adrenerge Signaltransduktionssystem in der Herzinsuffizienz

Im Rahmen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen im Signaltransduktionssystem der kardialen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Bristow, 1993; Port und Bristow, 2001). Die markanteste Veränderung betrifft die Herabregulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren. Bei terminal herzinsuffizienten Patienten wurde erstmals 1982 eine Verminderung der Rezeptordichte um etwa 50% beschrieben (Bristow et al., 1982). Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten in der Folgezeit zeigen, daß sich dieser Effekt auf eine verminderte mRNA-Expression des Rezeptors zurückführen läßt (Bristow et al., 1993; Ungerer et al., 1993). Wir konnten ferner zeigen, daß die Verminderung der Rezeptorexpression frühzeitig in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einsetzt und mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Engelhardt et al., 1996). Zudem kommt es zu einer funktionellen Entkopplung der verbleibenden Rezeptoren (Bristow et al., 1989), möglicherweise bedingt durch eine vermehrte Expression der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase GRK2 (Ungerer et al., 1993). Die verminderte Expression und Funktion des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors läßt sich als typisches Desensibilisierungsphänomen nach verstärkter und langdauernder Stimulation verstehen (Lohse, 1993). Dabei kommt es in der Herzinsuffizienzentwicklung zu einer chronisch verstärkten Freisetzung von Katecholaminen (Chidsey und Braunwald, 1966; Swedberg et al., 1990).



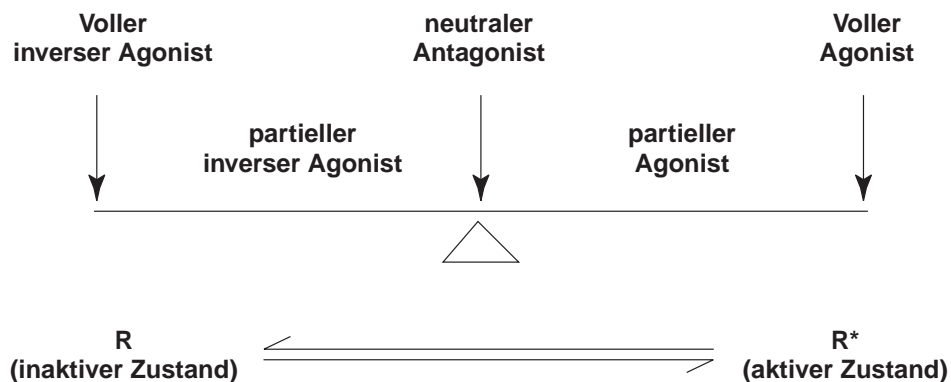
Ein deutlich anderes Regulationsmuster zeigt der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor. Hier kommt es zu keiner Verminderung der Rezeptordichte (Bristow et al., 1986), die mRNA-Expression des  $\beta_2$ -Rezeptors ist unverändert (Engelhardt et al., 1996; Ungerer et al., 1993). Es ist unklar, wie dieser Unterschied zu erklären ist, zumal der  $\beta_2$ -Subtyp in isolierten Zellen nach Agonist-Stimulation sehr stark herabreguliert wird (Danner et al., 1998; Hadcock et al., 1989a; Hadcock et al., 1989b). Auch bei diesem Subtyp tritt eine gewisse funktionelle Entkopplung in insuffizienten Herzen auf, deren Ausmaß die  $\beta_1$ -Rezeptor-Abschaltung jedoch nicht erreicht. Es kommt daher zu einer „Umschaltung“ von prädominant  $\beta_1$ -vermittelter Signaltransduktion ( $\beta_1:\beta_2=80:20$ ) hin zu  $\beta_2$ -vermittelter Signaltransduktion ( $\beta_1:\beta_2=50:50$ ) (Brodde, 1993).

Zudem verändert sich die Expression der inhibitorischen G-Proteine: Die Expression inhibitorischer G-proteine ( $G_{i\alpha 2}$ ) steigt an (Feldman et al., 1988; Neumann et al., 1988).

Diese Veränderungen wurden bereits bald nach ihrer Entdeckung für die Progression der Herzinsuffizienz mitverantwortlich gemacht, insbesondere als gezeigt wurde, daß die Herabregulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors stärker bei Patienten mit einer idiopathische Form der dilatativen Kardiomyopathie als bei solchen mit ischämischer Kardiomyopathie ausgeprägt war (Bristow et al., 1991). Folgerichtig wurden nun klinische Studien durchgeführt, die die Rezeptorabschaltung durch verstärkte Aktivierung mit  $\beta$ -Agonisten oder Phosphodiesterasehemmstoffen zu kompensieren versuchten (Übersicht bei (Lowe et al., 2000)). Während nach *akuter*  $\beta$ -adrenerger Stimulation zunächst meist eine rasche Besserung der Insuffizienzsymptomatik einsetzt, zeigten alle Studien eine erhöhte Mortalität nach *chronischer* Zufuhr von  $\beta$ -Agonisten (Lowe et al., 2000). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von  $\beta$ -Blockern zu einer Verminderung der Mortalität (Packer et al., 1996). Es besteht also die Frage welche Bedeutung der Herabregulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in der Herzinsuffizienz zukommt: Handelt es sich um einen Schutzmechanismus des Körpers vor adrenerger Überstimulation oder verschlechtert der Verlust dieses inotrop wirksamen Rezeptors die hämodynamische Situation noch weiter?

### Konstitutive Aktivität $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Interessanterweise scheinen die verschiedenen  $\beta$ -Blocker unterschiedlich wirksam zu sein. Eine Eigenschaft von Rezeptorantagonisten, die zu ihrer Wirksamkeit beiträgt, ist ihre Fähigkeit die konstitutive Aktivität eines Rezeptors zu beeinflussen. Unter konstitutiver Aktivität versteht man die Fähigkeit eines Rezeptors ein G-protein und die nachgeschaltete Signalkaskade auch in Abwesenheit eines Agonisten zu aktivieren. Demnach gibt es unter den an einem Rezeptor wirksamen Substanzen ein Kontinuum, das von vollen Agonisten (maximale Aktivierung des Rezeptors) über neutrale Antagonisten (kompetitive Verdrängung von Agonisten, keine intrinsische Wirksamkeit) bis hin zu inversen Agonisten (volle Abschaltung des Rezeptors) reicht. Die folgende Abbildung verdeutlicht dieses Modell der Rezeptoraktivität.



**Abb. 3. Modell der verschiedenen Aktivitätszustände eines Rezeptors (nach Milligan et al., 1995).** Für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren existieren demnach mehrere verschiedene Konformationen, die sich zwischen der völligen Rezeptorabschaltung (R) und seiner maximalen Aktivierung (R\*) befinden. Substanzen, die an einem Rezeptor wirksam sind, können das Gleichgewicht hin zu verstärkter Aktivierung (Agonisten) oder in Richtung des inaktiven Zustandes (inverse Agonisten) verschieben. Neutrale Antagonisten haben nur indirekt Einfluß auf dieses Gleichgewicht, indem sie die Bindung von Agonisten an den Rezeptor verhindern.

G-protein-gekoppelte Rezeptoren unterscheiden sich in dem Ausmaß, in dem sie die konstitutive Aktivität eines Rezeptors beeinflussen (de Ligt et al., 2000). Unter den adrenergen Rezeptoren ist insbesondere der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor in dieser Hinsicht untersucht worden. Zunächst wurde dabei in vitro in rekonstituierten Systemen (Freissmuth et al., 1991) und nach Überexpression von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in Zellkultur (Adie und Milligan, 1994; Chidiac et al., 1994) gezeigt, daß

dieser Rezeptor deutliche spontane Aktivität in Abwesenheit eines Rezeptoragonisten zeigt. Später konnte dies dann auch in transgenen Tieren in vivo gezeigt werden (Bond et al., 1995)). Isolierte Vorhöfe von transgenen Mäusen mit 200-facher Überexpression des  $\beta_2$ -Rezeptors zeigten eine erhöhte Kraftentwicklung und Schlagfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Beides wurde um 70% durch ICI-118551 inhibiert, das damit als inverser Agonist am  $\beta_2$ -Rezeptor wirkte. Trotz der ungleich höheren klinischen Bedeutung von  $\beta_1$ -Rezeptorblockern im Vergleich zu  $\beta_2$ -blockierenden Substanzen existieren derzeit keine vergleichbaren Studien für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor.

## **Transgene Tiere zur Untersuchung kardial exprimierter Gene in vivo**

Seit Anfang der 80er Jahre steht die Technik der Generierung transgener Tiere zur Verfügung (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982). Dabei wurde zunächst die Überexpression eines Gens nach pronukleärer Injektion eines DNA-Konstrukts realisiert, während es erst 7 Jahre später gelang gezielt ein einzelnes Gen durch homologe Rekombination zu inaktivieren (Doetschman et al., 1987; Thomas und Capecchi, 1987). Bald darauf wurden auch die ersten kardiovaskulären Phänotypen berichtet. Während sich die Charakterisierung zu Beginn noch auf die morphologische Untersuchung der Herzen transgener Tiere beschränkt war, wurden bald miniaturisierte physiologische Techniken entwickelt, die es ermöglichten bereits an der Ratte etablierte Techniken auf die Maus als Modellorganismus zu übertragen (Hoit, 2001; James et al., 1998; Rao und Verkman, 2000). Heute ist eine umfassende funktionelle Charakterisierung des Mauseherzens von der Untersuchung isolierter einzelner Kardiomyozyten (Zhou et al., 2000a) bis hin zur nicht-invasiven Bildgebung an anästhesierten Tieren mit Hilfe der miniaturisierten Kernspintomographie (Wiesmann et al., 2000) möglich. Innerhalb der letzten Jahre ist die Maus daher auch im Bereich der kardiovaskulären Forschung zu einem zentralen Modellorganismus geworden. Die vergleichsweise einfache genetische Manipulierbarkeit und die inzwischen etablierten physiologischen Techniken dürfen jedoch nicht über grundsätzliche Unterschiede im kardiovaskulären System hinwegtäuschen, die zwischen der Maus als Modellorganismus und dem menschlichen Organismus als abzubildendes System bestehen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über grundlegende physiologische Parameter bei Mäusen und Menschen.

**Tab.2. Vergleich physiologischer Parameter bei Maus und Mensch (Durchschnittswerte)**

| Physiologischer Parameter             | Maus       | Mensch | Referenz   |
|---------------------------------------|------------|--------|--|
| Herzfrequenz (Schläge/min)            | 550        | 73     | (Wiesmann et al., 2000)<br>(Siegenthaler, 2001)                      |
| Blutdruck (systolisch in mmHg)        | 80-120     | 90-140 | Eigene Messungen und<br>(Siegenthaler, 2001)                         |
| Kontraktilität $dp/dt_{max}$ (mmHg/s) | 8000-16000 | 1900   | (Palakodeti et al., 1997)<br>(Kass et al., 1998)<br>Eigene Messungen |
| Schlagvolumen (ml)                    | 0,038      | 70     | (Wiesmann et al., 2001)<br>(Siegenthaler, 2001)                      |
| Atemfrequenz (min <sup>-1</sup> )     | 106-163    | 12     | (Rao und Verkman, 2000)<br>(Siegenthaler, 2001)                      |

In den letzten Jahren sind eine Reihe von transgenen Modellen mit dem Ziel generiert worden, zentrale Mechanismen der Hypertrophieentwicklung aufzuklären (Hunter und Chien, 1999; Molkentin und Dorn, 2001; Sugden und Clerk, 1998a). Neben Strukturproteinen und kontraktilen Proteinen, auf deren Mutation ein Teil der familiären Kardiomyopathien beruht, wurden eine Reihe von intrazellulären Signalwegen als wichtig für die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie identifiziert. Dies beinhaltet verschiedene heterotrimere und kleine G-proteine, MAP-Kinasen, die Proteinkinase C, Calcineurin und gp130-, TGF $\beta$ - und Insulin-like growth factor-vermittelte Signale (Molkentin und Dorn, 2001). Ein großer Teil der genannten Kandidaten wurde dabei sowohl in transgenen Tiermodellen, in denen diese Proteine kardial überexprimiert wurden, als auch in in vitro durchgeführten Experimenten an isolierten Kardiomyozyten als maßgeblich an der Hypertrophieentwicklung beteiligt identifiziert. Für eine Reihe dieser Proteine ist zudem gezeigt, daß ihre Inhibition die Ausbildung einer Hypertrophie inhibieren kann, die Inhibition der Hypertrophie betrug dabei jeweils zwischen 50-90%. Dies deutet darauf hin, daß diese Signalwege nicht als voneinander unabhängig verstanden werden dürfen, sondern wahrscheinlich vielfältig interagieren. Es ist daher davon auszugehen, daß es keinen einzelnen zentralen Hypertrophieweg gibt, sondern eine ganze Reihe beteiligter Mechanismen die in ein kompliziertes Netzwerk eingebunden sind.

## Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Versuch gemacht werden durch die Kombination von transgenen Tiermodellen und miniaturisierter physiologischer Methodik die Funktion von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren am menschlichen Herzen zu charakterisieren. Bei diesem außerordentlich intensiv beforschten Rezeptorprotein sind wesentliche Fragen seiner Funktion *in vivo* bislang ungeklärt. Die wesentlichen Fragen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollten betrafen

### **Die Bedeutung der $\beta_1$ -Rezeptorabnahme für die Pathogenese der Herzinsuffizienz.**

Stellt diese Abnahme einen Schutz des Herzens vor den schädlichen Auswirkungen einer chronischen adrenergen Überstimulation dar, oder führt der Verlust eines großen Teils dieses inotropen Signalweges zu einer weiteren Verschlechterung der hämodynamischen Situation? Hierzu sollen transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors generiert werden um anhand dieser Tiere die Auswirkungen chronischer Stimulation von kardialen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf das Myokard zu untersuchen.

### **Sind $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren konstitutiv aktiv?**

Antagonisten an  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren zeigen in der klinischen Anwendung deutliche Unterschiede. Anhand der  $\beta_1$ -Rezeptor überexprimierenden Mäuse soll untersucht werden, ob  $\beta_1$ -Rezeptoren konstitutiv aktiv sind und ob die unterschiedliche klinische Wirksamkeit von  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten auf ihrer Fähigkeit beruht diese konstitutive Aktivität zu antagonisieren.

### **Worin könnte der Grund für das Vorhandensein zweier verschiedener Rezeptorsubtypen im Myokard bestehen?**

Ging man bislang davon aus, daß  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren sich insbesondere durch ihre unterschiedliche Verteilung auf verschiedene Organe oder verschiedene Zelltypen innerhalb von Organen unterscheiden, so ist inzwischen klar,

daß auf Herzmuskelzellen beide Subtypen vorkommen. Es ist jedoch weitgehend unklar, weshalb zwei Subtypen benötigt werden. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob hier eine funktionelle Redundanz vorliegt, oder aber ob sich die beiden Rezeptorsubtypen in ihrer Signaltransduktion unterscheiden. Während ältere Arbeiten die u.a. an isolierten Herzpräparaten durchgeführt wurden darauf hindeuten, daß hier vor allem funktionelle Redundanz vorliegt, gibt es einige neuere in vitro durchgeführte Studien an isolierten Zellen, die auf deutliche Unterschiede der Kopplung an G-proteine und intrazelluläre Signalwege der beiden Rezeptorsubtypen hindeuten. Letztere Untersuchungen haben jedoch den Nachteil, daß in Ihnen lediglich sehr kurzfristige Veränderungen in Signalwegen nach Rezeptoraktivierung untersucht werden konnten. Durch den Vergleich zweier Tiermodelle, in denen vergleichbare Rezeptormengen des jeweiligen Rezeptorsubtyps im Herz überexprimiert werden, soll in der vorliegenden Arbeit der Versuch gemacht werden, etwaige Unterschiede einer chronischen Aktivierung beider Subtypen zu detektieren.

### **Welches sind die Mechanismen, über die chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation zu Herzhypertrophie führt?**

Die Möglichkeit, diese weitgehend ungeklärte Fragestellung anzugehen, ergab sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit als klar wurde, daß  $\beta_1$ -transgene Mäuse einen Phänotyp entwickeln, der in vielem der menschlichen Herzinsuffizienz sehr ähnlich ist. Es wurden dazu Myokardproben von Wildtyp-Mäusen und  $\beta_1$ -transgenen Mäusen in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entnommen und gezielt nach Unterschieden im Proteinexpressionsmuster von potentiellen Kandidatengen gesucht. Darüber hinaus wurde mit Hilfe sog. Gene Arrays *ungezielt* nach differentiell exprimierten Genen gesucht.

## METHODEN

### Molekularbiologische Methoden

#### Isolation genomischer DNA

Zugrunde liegt dieser Methode der Verdau des Proteinanteils der Probe durch eine Proteinase und anschließend die Anreicherung der DNA-Fraktion durch Extraktion des Ansatzes mit Phenol. Etwa 500 mg Gewebe werden über Nacht bei 50°C in Gegenwart von 0,1 mg Proteinase K (Roche) in 750 µl Verdauopuffer (100mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) verdaut. Die entstandene Lösung wird nun zweimal mit Phenol pH 7,5 und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 49:1) extrahiert. Die in der wässrigen Phase angereicherte genomische DNA wird nun mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt, pelletiert und mit 75% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird nun kurz getrocknet und bei 50°C für 15 min in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Southern Blots

Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für das Southern Blotting wurde das Verfahren des sog. Nick End-Labelings verwendet. Dieses Verfahren nutzt die DNA-Polymeraseeigenschaften des Klenow-Fragments der E. coli DNA-Polymerase aus. Der Reaktionsansatz lautete:

|   |          |
|---|----------|
| Zu markierendes DNA-Fragment 100ng                | x µl     |
| Desoxynukleotid-Mix (Pharmacia)                   | 1 µl     |
| α[ <sup>32</sup> P] dCTP (Amersham, 3000 Ci/mmol) | 2 µl     |
| 10-fach Klenow-Puffer (Pharmacia)                 | 1 µl     |
| Klenow-Polymerase (Pharmacia)                     | 1 µl     |
| H <sub>2</sub> O                                  | ad 10 µl |

Die Markierungsreaktion erfolgte nun für 60 min bei 37°C. Die radioaktiv markierte Sonde wurde nun von nicht-inkorporierten Nukleotiden durch Chromatographie über sog. Spin-columns (Pharmacia) gereinigt.



## Southern Blot

Für das Southern Blotting wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, die entstandenen Fragmente werden mittels Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert und auf eine Membran geblottet. Für einen bestimmten Genotyp spezifische Fragmente einer bestimmten Länge werden durch die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden indentifiziert. Für die Genotypisierung  $\beta_1$ -transgener Mäuse wurden zunächst 100  $\mu\text{g}$  genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Elektrophoresebedingungen: 20 Volt, für 18 Stunden. Nun wird die fraktionierte DNA im Gel durch Einweichen in 0.25M HCl für 30 min und in 1,5M NaCl/0,5M NaOH für zweimal je 30 min denaturiert und anschließend mit 1,5M NaCl/0,5M Tris-HCl pH 7.0 neutralisiert. Die DNA wird nun mittels der Kapillartransfermethode auf eine Nylonmembran geblottet. Dazu wird das Gel zunächst in Transferpuffer (20xSSC) gewaschen, auf einen passend zugeschnittenen Stapel Filterpapier (3mm, Schleicher&Schüll) plaziert und dann eine passend zugeschnittene Nylonmembran auf das Gel gelegt. Nun werden 20 Lagen trockenes Filterpapier aufgelegt. Der entstandene Stapel wird in eine Schale mit Transferpuffer gestellt und mit einem leichten Gewicht (ca. 100g) beschwert. Der Transfer der im Gel enthaltenen DNA-fragmente erfolgt nun mittels der entstehenden Kapillarkräfte für 14-20 Stunden. Die geblottete DNA wird nun durch Inkubation der Membran bei 80°C für 120 min auf der Membran fixiert. Vor der Hybridisierungsreaktion wird die Membran einer Prähybridisierung unterzogen um unspezifische Hybridisierung zu minimieren. Dazu wird die Membran bei 42°C und 5-7 Umdrehungen pro Minute in einem Hybridisierungssofen mit Lachssperma-DNA enthaltender Hybridisierungslösung (5xSSC, 5xDenhardts, 1%SDS) vorhybridisiert. Zusammensetzung der Lösung nach Denhardt (100x): 10g Ficoll 400, 10g Polyvinylpyrrolidone, 10g BSA, H<sub>2</sub>O ad 500ml.

Nach 2 Stunden Prähybridisierung wird die radioaktiv markierte und frisch denaturierte (10 min 100°C) Sonde zugegeben. Die spezifische Aktivität der Sonde sollte dabei mindestens 10<sup>8</sup>cpm/ $\mu\text{g}$  betragen. Die Hybridisierung erfolgt nun über Nacht bei 42°C und 5-7 Umdrehungen pro Minute. Die Hybridisierungslösung wird dann abgenommen und entsorgt. Die Membran wird nun mit steigender Stringenz gewaschen: 2 mal 10 minütiges Waschen mit 0,2x SSC/0,1%SDS bei Raumtemperatur und optional zusätzlich bei 42°C. Befindet sich nun noch ein

starkes Signal auf dem Southern Blot kann zusätzlich mit hoher Stringenz (0,1x SSC bei 68°C) gewaschen werden. Die gewaschene Membran wird nun auf einem Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) bei -70°C exponiert.

### **Isolation von RNA**

RNA wurde aus Gewebe mit der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Guanidiniumisothiocyanat Methode isoliert. Dazu wurden tiefgefrorene Gewebestückchen in 1 ml Aufschlußlösung (Trizol, Gibco) mit einem Homogenisator (Ultraturrax, IKA-Labortechnik) zerkleinert und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200 µl Chloroform zugegeben, der Ansatz 15 Sekunden geschüttelt und dann 15 Minuten bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Die in der Oberphase enthaltene RNA wurde mit 1 Volumen Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß gefällt und durch Zentrifugation mit 12000g für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde nun mit 2ml 75% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Nach Resuspendierung des Pellets in 50 µl H<sub>2</sub>O wurde im UV-Spektrometer die Absorption bei 260 und bei 280 nm Wellenlänge gemessen und daraus die Konzentration der RNA wie folgt berechnet: 1 Absorptionseinheit bei 260 nM = 40 µg RNA/ml. Die gelöste RNA wurde nun bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Reverse Transkription**

Zunächst wurden 500 ng RNA mit 2 µl Oligodt-Primern in einem Volumen von 11 µl 10 Minuten bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gegeben. Nach diesem Reaktionsschritt, der die Anlagerung der Oligodt-Primer an die 3' Enden der RNA bewirkt, wurde folgende Lösung angesetzt (angegeben sind jeweils die benötigten Volumina pro Probe): 4 µl 5fach Enzympuffer (Gibco), 2 µl DTT, 1 µl Desoxynukleotide (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOut, Gibco), 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco), 0,9 µl H<sub>2</sub>O. 9 µl dieser Lösung wurden nun zum Reaktionsansatz gegeben und dieser für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inaktivieren der reversen Transkriptase für 10 Minuten bei 70°C beendet. Das Reaktionsvolumen wurden nun durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O erhöht und der Reaktionsansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **Amplifikation von cDNAs mit der Polymerasekettenreaktion**

Zunächst wurde eine gemeinsame Stocklösung mit folgenden Bestandteilen pipettiert (auf Eis): je zu amplifizierender cDNA 5  $\mu$ l 10fach PCR-Puffer (Roche), 1,25  $\mu$ l Vorwärts-Primer (20  $\mu$ M), 1,25  $\mu$ l Rückwärts-Primer (20  $\mu$ M), 1  $\mu$ l 10 mM Desoxynukleotide, 0,25  $\mu$ l Taq Polymerase und 36,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Je 45  $\mu$ l dieser Stocklösung wurden nun in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und mit 5  $\mu$ l der revers transkribierten RNA (entspricht 50 ng revers transkribierter RNA) versetzt. Die Reaktionsansätze wurden nun in die auf 94°C vorgeheizte PCR-Maschine (Modell 2400 Perkin Elmer/Applied Biosystems) gegeben. Falls bei einzelnen DNAs nicht anders angegeben, erfolgte die Amplifikation mit folgenden Parametern: Denaturierung der Doppelstränge für 15 Sekunden bei 94°C, Anlagerung der Primer bei 55°C für 15 Sekunden und Verlängerung der durch die Primeranlagerung entstandenen doppelsträngigen Sequenzen in 5'-3'-Richtung bei 72°C für 30 Sekunden. Dieser PCR-Zyklus wurde 30-35 mal wiederholt.

### **Klonierung amplifizierter cDNAs**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifizierte DNAs besitzen an ihrem 3'-Ende ein überhängendes Adeninnukleotid unabhängig von der letzten Base die die DNA-Sequenz vorgibt. Diese Eigenschaft aller PCR-Produkte macht man sich bei der TA-Klonierung zunutze indem PCR-Produkte direkt in einen ein überhängendes Thymidinnukleotid enthaltenden Plasmidvektor kloniert werden. Das PCR-Produkt wurde dazu zunächst auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das die Bande enthaltende Gelstückchen wurde nun in einer Natriumjodid enthaltenden Lösung (Quiaex Gel Extraction Kit, Quiagen) bei 60°C aufgelöst und die gelöste DNA an eine zugegebene Silikatmatrix gebunden. Diese wurde nun durch Zentrifugation mehrfach pelletiert und gewaschen. Schließlich wird das die gebundene DNA enthaltende Silikat-Pellet getrocknet und anschließend die DNA mit einem kleinen Volumen (üblicherweise 100  $\mu$ l) H<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde durch gemeinsame Auftrennung mit DNAs bekannter Konzentration auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bestimmt. Die aufgetragene DNA-Menge wurde dabei durch den Vergleich der Bandenintensitäten geschätzt. Zur Herstellung des Thymidinnukleotid-Überhänge (T-Überhänge) enthaltenden Vektors wurde zunächst das Plasmid Bluescript KS (Stratagene) mit dem blunt-schneidenden

Enzym EcoRV verdaut. Die T-Überhänge wurden nun durch Verlängerung des verdauten Plasmids mit Hilfe von Taq-Polymerase in Gegenwart von 1 mM Thymidinnukleotiden angefügt. Vektor und gereinigtes PCR-Produkt werden nun in einem autoklavierten Reaktionsgefäß wie folgt zusammengegeben: 10 ng Plasmidvektor, 10 ng PCR-Produkt, 4 µl 5fach Ligasepuffer, H<sub>2</sub>O ad 20 µl, (Roche), 1 µl T4-Ligase. Der Reaktionsansatz wurde nun für 4-8 Stunden bei 15°C inkubiert und nach Inaktivierung der Ligase für 10 min bei 70°C zur Transformation kompetenter E. coli verwendet.

### **Transformation kompetenter E. coli mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation wurden kompetente E. coli des Stammes DH5α (Stratagene) verwendet. Ein Aliquot tiefgefrorener Bakterien wurde dabei langsam auf Eis aufgetaut und je 50 µl wurden in ein autoklaviertes und vorgekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurden 2 µl des Ligationsansatzes zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun erfolgte ein Hitzeschock durch Inkubation für 20 Sekunden bei 37°C. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 950 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz zur Expression des Ampicillinresistenzgens 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde nun auf Ampicillin-enthaltenden Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Identifizierung positiver Klone mit Hilfe der PCR**

Es wurde wiederum zunächst eine gemeinsame Stocklösung mit folgenden Bestandteilen pipettiert (auf Eis): je zu amplifizierendem Klon 5 µl 10fach PCR-Puffer (Roche), 1,25 µl Vorwärts-Primer (T3-Sequenz 5`-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3`, 20 µM), 1,25 µl Rückwärts-Primer (T7-Sequenz 5`-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3`, 20 µM), 1 µl 10 mM Desoxynukleotide, 0,25 µl Taq Polymerase und 41,25 µl H<sub>2</sub>O. Auf dem Boden der Agarplatte wurde jedem zu amplifizierenden Klon eine Nummer zugeordnet. Je 50 µl der Stocklösung wurden nun in PCR-Reaktionsgefäße gegeben und es wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein kleiner Teil der E.coli-Kolonie von der Agarplatte aufgenommen und zur PCR-Reaktion gegeben. Das PCR-Produkt positiver, d. h. das gewünschte Ligationsprodukt enthaltender, Klone zeigte in der Agarosegelelektrophorese die erwartete Zunahme der Größe des amplifizierten Fragments. Der Kolonierest der so identifizierten positiven Klone wurde

nun zur Animpfung von Flüssigmedium für Präparationen im kleinen (sog. Mini-Präparationen) bzw. größeren Maßstab (sog. Maxi-Präparationen) verwendet.

### **Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli**

Mit einer einzelnen Kolonie angeimpfte Flüssigkulturen (250 ml LB-Medium) wurden in 2 Liter-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 180 rpm geschüttelt. Die Kultur wird dann 10 Minuten bei 5000g abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 10 ml Puffer 1 (Quiagen) aufgenommen. In der nun folgenden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien lysiert und die freiwerdende RNA wurde durch die im Puffer enthaltene RNase verdaut. Nun wurden 10 ml Puffer 2 zugegeben, es erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer 3 und Inkubation auf Eis wurde die hochmolekulare genomische DNA zusammen mit SDS präzipitiert und dann 30 Minuten bei 15000g abzentrifugiert. Der die gelöste Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde nun mittels Säulenchromatographie weiter aufgereinigt. Dazu wurde der Überstand auf eine Säulenmatrix (Qiagen) gegeben und diese dann mit einem Waschpuffer (QC, Quiagen) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA wurde nun durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und bei 15000 g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde nun mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **Restriktionsenzymverdau von Plasmiden**

Die zu verdauende Menge Plasmid wurde in 18 µl H<sub>2</sub>O (Volumen nach Zugabe des Plasmids) und 2 µl des entsprechenden 10fach Restriktionsenzympuffers aufgenommen. Nun wurden pro µg zu verdauender DNA 5 Einheiten des Restriktionsenzymys zugegeben, gemischt und falls vom Hersteller nicht anders angegeben bei 37°C für 2 Stunden verdaut.

### **In vitro Transkription zur Herstellung von Antisense RNA**

Zur in vitro Transkription wurden SP6-, T3- und T7-RNA-Polymerasen und Inkubationspuffer der Firma Ambion verwendet. Es wurden dazu 2 µl 10fach Transkriptionspuffer, je 10 nmol ATP, CTP und GTP, 0,5 pmol UTP und 12,5 pmol mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiertes UTP zu 0,5 µg linearisierter Plasmid-DNA gegeben. Die Transkription wurde durch Zugabe der RNA-Polymerase gestartet. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Inkubation bei 95°C gestoppt und die

enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 2  $\mu$ l DNase I für 15 Minuten bei 37°C verdaut. Der Transkriptionsansatz wurde nun auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach kurzer Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm wurde dieser entwickelt und wieder mit dem Gel zur Deckung gebracht. Die mit den durch das radioaktiv markierte Transkript geschwärzten Bereichen des Films korrespondierenden Bereiche des Polyarylamidgels wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Das im Gelstück enthaltene RNA-Transkript wurde durch Inkubation in 500  $\mu$ l Elutionspuffer (Ambion) eluiert und die inkorporierte Radioaktivität im Beta-Counter bestimmt.

### **Quantifizierung von mRNA mit dem RNase Protection Assay**

Zur quantitativen Bestimmung bestimmter mRNAs diente Gesamt-RNA, die nach der Methode von Chomczynski und Sacchi präpariert wurde. Als Sonden dienten mit  $^{32}\text{P}$  markierte in vitro transkribierte Antisense-RNAs (siehe vorhergehender Abschnitt). In einem Reaktionsansatz wurden bis zu 5 verschiedene Sonden mit unterschiedlichen Längen eingesetzt. Diese wurden nach Fraktionierung mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese aus dem Gel eluiert und mit 1-10  $\mu$ g Gesamt-RNA vermischt. Aus dieser Lösung wurden RNA und Antisense-Sonde nun durch Zugabe von 1/10 Vol.  $\text{NH}_4\text{Oac}$  und 2,5 Volumen Ethanol kopräzipitiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei  $-80^\circ\text{C}$  wurde das Präzipitat 15 Minuten bei 20000g abzentrifugiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde nun in 10  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (Ambion) aufgenommen, 3 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  und dann 12 Stunden bei  $45^\circ\text{C}$  inkubiert. Einzelsträngige, d.h. nicht hybridisierte RNA wurde nun durch Zugabe von RNaseA/T1 (Ambion) und Inkubation für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Nach erneuter Fällung der RNA-Hybride wurde das resultierende Pellet dann mit 6  $\mu$ l Ladepuffer versetzt, kurzzeitig auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und auf ein 20 mal 40 cm großes 5 %iges Sequenziergel geladen. Die Auftrennung der RNA-RNA-Hybride erfolgte 2-3 Stunden bei 35 Watt. Das Gel wurde nun auf ein Filterpapier (Whatman) transferiert, auf einem Geltdrockner getrocknet und auf einem Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) mit Verstärkerfolie exponiert. Nach Exposition auf einem Röntgenfilm wurde das Gel zudem auf einer mit Europium beschichteten Platte exponiert und diese in einem Phosphoimager quantitativ ausgewertet.

## Untersuchung differentiell exprimierter Gene mit cDNA Expression Arrays

### Kommerzielle Nylonmembran-Filter (1200 Mausgene)

Hierzu wurden kommerziell erhältliche Nylonmembranfilter der Firma Clontech verwendet. Auf diesen Membranen sind jeweils 1200 Maus-cDNAs in einem Koordinatensystem geordnet aufgebracht. Durch Inkubation dieser Membranen mit einem radioaktiv markierten cDNA-Pool aus Mausgewebe kann bestimmt werden welche cDNA bzw. deren zugrundeliegende mRNA in dem Ausgangsgewebe exprimiert wird. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA die aus Mauseherzen isoliert wurde. 10 µg dieser RNA wurden nun in Gegenwart eines mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten Nukleotids revers transkribiert. Die radioaktiv markierte cDNA wurde nun durch Chromatographie über kleine Sepharose-Säulchen von nicht-inkorporierten Nukleotiden getrennt und die Effizienz des Einbaus durch Zählung von 2 µl des Ansatzes im Beta-Counter bestimmt. Die Membranen wurden unterdessen in Hybridisierungsflaschen bei 68°C und 10 Umdrehungen pro Minute prähybridisiert. Dazu wurden 3 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech), die mit 100 µg denaturierter Lachssperma-DNA (Sigma) versetzt wurde, verwendet. Nach 2 Stunden Prähybridisierungszeit wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und durch 3 ml auf 68°C erwärmte Hybridisierungslösung ersetzt, die  $5 \times 10^6$  cpm der radioaktiven cDNA-Sonde enthielt. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung der Sonde für 12 Stunden bei 68°C. Nun wurde die Membran wie folgt gewaschen:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 2 fach SSC/2% SDS     | 2 malige Wiederholung, je 30 min bei 68°C |
| 0,1 fach SSC/0.5% SDS | 2 malige Wiederholung, je 30 min bei 68°C |
| 2 fach SSC            | 5 min bei Raumtemperatur                  |

Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran sofort in Frischhaltefolie verpackt und auf einer Phosphoimagerplatte exponiert.

### High density Gene Arrays (23000 Mausgene)

Dieser Methode liegt eine Hybridisierung von radioaktiv markierten cDNA-Sonden mit auf einer Nylonmembran immobilisierten Maus-cDNAs zugrunde. Die Herstellung der Nylonmembranen erfolgte dabei im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (Abteilung Prof. Hans Lehrach). Mit Hilfe von Robotern wurden dort insgesamt 23.000 Maus-cDNAs PCR-amplifiziert und jeweils 10 ng eines PCR-Produkts wurden

mit Hilfe von Spotting-Robotern auf Nylonmembranen aufgebracht und dort mit alkalischer Denaturierung und UV-Crosslinking immobilisiert. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der RNA wurden je 5 Herzen von transgenen und nichttransgenen Geschwistertiere isoliert und daraus nach der Methode von Chomcynski Gesamt-RNA präpariert. Nun folgte eine Anreicherung der PolyA-RNA mittels Säulenchromatographie über Oligodt-Säulen (Pharmacia). Die eluierte PolyA-RNA wurde nun wie radioaktiv markiert (siehe oben) und es folgte nun eine 30minütige Prähybridisierung der Membranen mit Hybridisierungspuffer (ExpressHyb, Clontech) in dem 50 ng/ml denaturierte Lachssperma-DNA enthalten war. Diese Prähybridisierung wurde bei kontinuierlicher Rotation bei 68°C durchgeführt. Die Hybridisierungslösung wurde nun abgossen und durch 8ml frische Hybridisierungslösung ersetzt, die die gesamte radioaktiv markierte Sonde enthielt. Nun erfolgte eine 5stündige Hybridisierung bei 68°C gefolgt von einer 30stündigen Hybridisierung bei 68°C. Die Membranen wurden nach Entsorgung der Hybridisierungslösung 5 mal bei Raumtemperatur mit 1xSSC/0,1%SDS gewaschen und anschließend bei zweimal bei 68°C für 30 Minuten mit 0,1 SSC/0,1% SDS. Die Membranen wurden nun auf einer Phosphoimagerfolie für 2 Tage exponiert und in einem Phosphoimager (BAS 1800, Fuji) ausgelesen. Die Phosphoimagerdaten wurden nun mit einem Datenverarbeitungsprogramm zur Bildanalyse von Genearrays analysiert (AIDA, Raytest). Dazu wurde über dem Phosphoimagerbild ein Gitternetz definiert, in dem jedes Kästchen einer aufgetragenen cDNA entspricht. Die Intensität des radioaktiven Signals wurde nun für jedes Kästchen berechnet und in einem Excel-kompatiblen Format exportiert. Der Datensatz wurde nun in Excel (Microsoft) weiterverarbeitet. Ebenfalls in Excel wurden nun eine Datei importiert, die die Zuordnung der einzelnen Koordinatenpositionen zu den jeweiligen Genbank-Nummern enthält. Die Expressionsstärke einzelner Punkte auf der mit transgener cDNA hybridisierten Membran wurde nun mit der Expressionsstärke korrespondierender Punkte auf der mit nichttransgener cDNA hybridisierten Membran verglichen. Dazu wurde der Quotient beider Hybridisierungssignale (Transgen/Nichttransgen) gebildet. Als signifikant wurde ein Expressionsunterschied größer Faktor zwei angenommen.



## **Proteinanalytische Methoden**

### **Herstellung von zytosolischen Lysaten aus Gewebe**

Gefrorene Herzgewebestücke wurden in 800 $\mu$ l Lysispuffer (50mM Tris pH 6,7, 2% SDS, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml Leupeptin) gegeben und sofort mit einem Gewebshomogenisator zerkleinert. Zum Verdau genomischer DNA wurde nun 1/10 Volumen 6% Benzonase (Roche) zugegeben und unter mehrmaligem vortexen 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 5min in einem Ultraschallbad inkubiert und anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (BCA-Assay der Firma Pierce). Nun wurde jeweils 1/40 Volumen Mercaptoethanol und 1/10 Volumen Ladepuffer (etwas Bromphenolblau in 50% Glycerin/50% H<sub>2</sub>O) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei 60°C wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Präparation der Membranfraktion aus Gewebe**

Zur Präparation einer grob angereicherten Membranfraktion aus Zellen und aus Gewebe wurde das Ausgangsmaterial zunächst durch Zerkleinerung in hypotonem Puffer (5 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,4) aufgeschlossen. Als Aufschlusswerkzeug diente dazu ein Homogenisator (Ultraturrax, IKA-Labortechnik), der bei 15000 Upm betrieben wurde. Im nächsten Schritt wurden Zellkerne und unzerkleinerte Gewebsfragmente durch Zentrifugation bei 500 g entfernt. Der Überstand dieser ersten Zentrifugation wurde nun 30 Minuten bei 50000 g und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Membranpellet in Resuspensionspuffer (75 mM Tris, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, pH 7.4) resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Membranfraktion wurde mit Hilfe der Methode von Lowry bestimmt.

### **Größenfraktionierung von Proteinen mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting**

Proteinlysate wurden mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Ausubel et al., 1995). Es wurden durchweg Mingele (Biorad) im Format 8,5 mal 5,5 cm verwendet, die angelegte Spannung betrug 100 (Sammelgel) bzw. 200 Volt (Trenngel) für ca. 90 min. Die Proteine wurden anschließend in einer Naßblotapparatur (Hoefer) auf Nitrozellulosemembranen (Protran, Schleicher und

Schuell) geblottet (60 min 400-100 mA, je nach Größe des zu detektierenden Proteins).

### **Antikörperdetektion von Proteinen**

Die Nitrozellulosemembranen wurden nach dem Blotten zunächst in sog. Blockpuffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2% BSA, 0,2% NP40) für 60 min inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Dann wurde mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:400 – 1:1000 in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde nun 6 mal für je 5 min mit Waschlösung gewaschen und dann 60 min mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen des Blots wurde mittels Chemilumineszenz detektiert (Ausubel et al., 1995).

### **Quantifizierung von Rezeptoren mit Radioligandenbindung**

5-50 µg einer Membranfraktion wurden in 75 mM Tris/ 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>/ 5 mM EDTA pH 7.4 mit 300-1200pM <sup>125</sup>I-Cyanopindol inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 37°C, danach wurde der gesamte Ansatz über GF/C-Filter (Whatman) abgesaugt und die gebundene Radioaktivität im γ-Counter gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1-10 µM Propranolol bestimmt.

## **Generierung transgener Tiere**

### **Reinigung des DNA-Konstrukts**

Um den Expressionsvektor zu linearisieren und um Vektorsequenzen abtrennen zu können, wurde der Vektor zunächst mit dem Restriktionsenzym SpeI verdaut und anschließend auf einem 1%igen Agarosegel größenfraktioniert. Die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und mittels eines kommerziellen Reinigungskits (Quiaex, Quiagen) aus dem Gelstück isoliert. Die gelöste DNA wurde nun über Nacht gegen 10 mM Tris/ 0,1 mM EDTA pH 7.4 dialysiert. Das Konstrukt wurde nun filtriert (Porenweite des Filters 0,2 µm, Schleicher & Schuell) und die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch Gelauftrag und Intensitätsvergleich der Ethidiumbromid-fluoreszenz mit der bekannter Mengen eines DNA-Standards abgeschätzt. Das Konstrukt wurde auf eine Endkonzentration von 2 ng/µl verdünnt und bis zur Injektion bei -20°C gelagert.

### **Superovulation von Spendermäusen und Gewinnung befruchteter Oozyten**

Zum Mittelpunkt des Lichtzyklus wurde 4-8 Wochen alten weiblichen FVB-Mäusen PMS (pregnant mare`s serum, Gonadotropin, 7,5 Einheiten) intraperitoneal appliziert. 46 Stunden später wurden 7,5 Einheiten HCG (humanes Choriongonadotropin) injiziert um die Reifung und Ovulation einer möglichst hohen Zahl von Oozyten zu induzieren. Nach der Injektion von HCG wurden die Tiere mit männlichen FVB-Mäusen verpaart. Am folgenden Tag wurden morgens die Eileiter der Tiere entnommen, in 300 µg/ml Hyaluronidase enthaltendes M2-Medium (Typ IV-S, Sigma) gegeben und unter der Stereolupe der Teil des Ovidukts aufgesucht, der die Oozyten enthielt. Nach Eröffnung des Ovidukts wurden die Oozyten mit einer Transferkapillare (100 µm Innendurchmesser) aufgenommen und sukzessive in 5 Tropfen Hyaluronidase-freies M2-Medium transferiert.

### **Pronukleäre Injektion**

Die isolierten befruchteten Eizellen wurden nun in M2 Medium gegeben, das auf einen Objektträger aufgetropft war. Dieses kleine Volumen Medium wurde nun mit einem Strich Silikonpaste umgeben und auf dem Tisch eines inversen Mikroskops mit Differenz-Interferenz-Kontrast (Leica) befestigt. Dann wurde das Medium mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Evaporation zu vermeiden. Injektionskapillaren wurden mit Hilfe eines Kapillarenziehgeräts (Sutter Instruments) ausgezogen und mit feinen Pipettenspitzen (Microloader, Eppendorf) mit dem verdünnten DNA-Konstrukt befüllt. Nun wurden die Kapillaren an die Druckluftleitung eines Injektionsgerätes (Transjektor, Eppendorf) angeschlossen und in einen Mikromanipulator eingespannt. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde eine Haltekapillare (Vacutip, Eppendorf) in einen zweiten Mikromanipulator eingespannt und mit einem Silikonschlauch verbunden. Über das Mundstück des Silikonschlauchs wurde ein Unterdruck erzeugt und damit eine einzelne Eizelle fixiert. Unter 400-facher Vergrößerung wurden nun die Pronuklei der Oozyten aufgesucht und in diese mit Hilfe der Injektionskapillare ein kleines Volumen (ca. 1 fl) DNA-Lösung injiziert. Die Injektionsmenge wurde so eingestellt, daß eine leichte Schwellung der Pronuklei zu erkennen war.

### **Ovidukttransfer**

Die injizierten Oozyten wurden nun mit einer Transferkapillare aufgenommen. Dazu wurden zunächst 2 Luftblasen aufgenommen, dann 10-20 Oozyten dichtgepackt und

zuletzt wieder eine kleine Luftblase. Nun wurden als Ammenmäuse bezeichnete weibliche CD1-Mäuse die am Tag zuvor mit durch Vasektomie sterilisierten männlichen Mäusen verpaart wurden, mit Ketamin/Xylazin s.c. narkotisiert. Nach einem Hautschnitt sowie einer kleinen lateralen subcostalen Inzision in die Bauchhaut wurde das Ovar aufgesucht und mit einer kleinen Klemme fixiert. Unter der Stereolupe wurde sodann an einer geeigneten Stelle die Bursa ovarica mit zwei Pinzetten (DuMont No. 5) eröffnet und mit einer Pinzette die Ampulle des Ovidukts fixiert. Mit der anderen Hand wurde nun die mit den Oozyten beladene Transferkapillare in die Ampulle eingeführt. Mit leichtem Druck über ein Mundstück, das durch einen Schlauch mit dem Kapillarenhalter verbunden ist, wurden die Luftblasen und die dazwischen befindlichen Oozyten in die Ampulle transferiert. Der Wundverschluß der Bauchwand erfolgte nun mit zwei bis drei Einzelkopfnähten, der Schnitt im Fell des Tieres wurde ebenfalls mit einigen Einzelkopfnähten verschlossen.

### Genotypisierung transgener Tiere

Genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien isoliert wie bereits beschrieben. Die so erhaltene DNA-Lösung wurde 1:50 verdünnt und 5 µl wurden in die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt. Die Sequenz der Primer lautete wie folgt:

| Primer          | Orientierung | Sequenz                      | Produktlänge |
|-----------------|--------------|------------------------------|--------------|
| $\alpha$ MHCmf1 | vorwärts     | AGG ACT TCA CAT AGA AGC CTAG | 272 bp       |
| $\beta_1$ humr1 | rückwärts    | TGT CCA CTG CTG AGA CAG CG   |              |
| $\beta_1$ mf5   | vorwärts     | ATG GCC TTC GTG TAC CTG C    | 200 bp       |
| $\beta_1$ mf5   | rückwärts    | AGA GCC ACG AGG CGC GAC      |              |

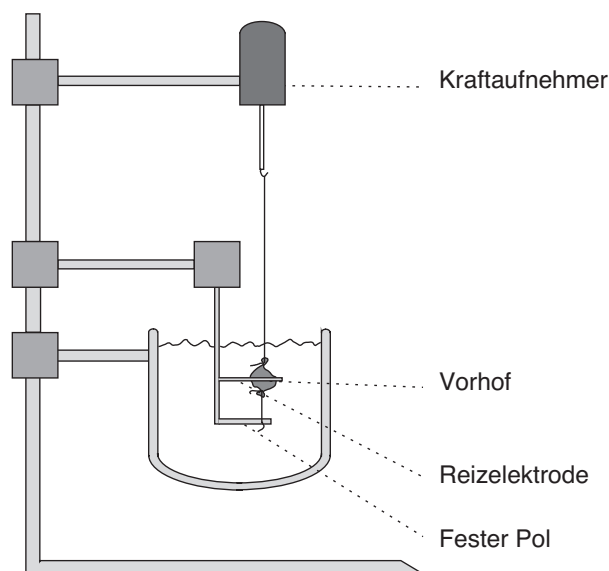
Die PCR-Bedingungen entsprachen dabei den bei der Amplifikation von cDNAs bereits beschriebenen, mit Ausnahme einer Zugabe von 5% DMSO (Endkonzentration) zum Ansatz. Die Zeitintervalle der PCR-Reaktion betragen 95°C für 15 sec. 55°C für 15 sec. und 72°C für 30 sec. Die 2. PCR-Reaktion mit den Primern  $\beta_1$ mf5 und  $\beta_1$ mr5 amplifiziert dabei den endogenen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor der Maus und dient als Kontrollreaktion, um zum Beispiel Verunreinigungen oder unzureichende DNA-Konzentrationen zu erkennen. Alle getesteten DNA-Proben

müssen in der Kontrollreaktion die erwartete Bande zeigen, in der 1. PCR zeigt sich nur bei den transgenen Tieren eine Bande.

## Physiologische Methoden

### Untersuchung isolierter Vorhöfe im Organbad

Alle Versuche wurden mit Tyrode-Lösung folgender Zusammensetzung durchgeführt: NaCl 119,8 mM, KCl 5,4 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $NaHCO_3$  22,6 mM,  $NaH_2PO_4$  0,42 mM,  $CaCl_2$  1,2 mM. Vor Versuchsbeginn wurden der Lösung 1,8 g Glucose, 50 mg Ascorbat und 220mg Pyruvat pro Liter zugegeben. Die Mausherzen wurden nach zervikaler Dislokation entnommen, in mit Carbogen begaster Tyrode gewaschen und die Vorhöfe wurden abgetrennt. An den beiden Enden der Vorhöfe wurde nun jeweils ein Faden angeschlungen. Das eingekürzte Ende der Fäden wurde nun mit Hilfe eines Histoacrylklebstoffes an dem fixierten Pol einer isolierten Organbadapparatur befestigt. Das andere Fadenende wurde an einem Kraftaufnehmer befestigt (Abb. 4).



**Abb. 4. Organbadapparatur zur Untersuchung isolierter Mausvorhöfe.** Der Kraftaufnehmer wird an einen Brückenverstärker angeschlossen, der das Signal an ein MacLab-System weitergibt.

Die Organbäder wurden mit Tyrode gefüllt und kontinuierlich mit Carbogen begast. Der Inhalt der Organbäder wurde vor Meßbeginn vielfach gewechselt (5 Waschperioden mit je ca. 5fachen Volumenaustausch über 15 min). An allen Vorhöfen wurde eine Vorspannung von 0,8 mN angelegt. Linke Vorhöfe wurden elektrisch mittels Feldstimulation mit einer Frequenz von 5 Hz gereizt. Die angelegte Spannung wurde am Potentiometer des Stimulators (Hugo Sachs Elektronik) so eingestellt, daß sie etwa 20% über der Schwelle zur Auslösung einer Kontraktion lag.

### **Linksherzkatheterisierung von transgenen Mäusen**

Die zu untersuchenden Mäuse wurden mit Tribromethanol (13 µl einer 2,5%igen Lösung i.p.) anaesthetisiert. Nach Fixierung des Tieres auf einer Wärmplatte (39°C) wurde zunächst eine zervikale Inzision vorgenommen und die rechte Arteria carotis unter einer Stereolupe stumpf freipräpariert. Diese wurde nun im Abstand von 1 cm mit 2 Fäden umschlungen, wobei der distale Faden über der Carotis verknötet wurde. Durch Zug an diesem Faden wurde das Gefäß vorgespannt. Mit einer Augenschere wurde nun eine kleine Inzision in der Gefäßwand gesetzt. Die so entstandene Öffnung wurde mit einer rechtwinklig abgebogenen Kanüle offengehalten und durch diese Öffnung wurde ein Mikromanometer-Katheter (Millar Instruments) inseriert. Unter ständiger Kontrolle der Druckkurve auf dem Monitor wurde der Katheter durch die Aortenklappe bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Der Eintritt in den linken Ventrikel ist durch einen markanten Abfall des diastolischen Blutdruckwertes erkennbar. Pharmaka wurden intravenös über die linke Vena jugularis gegeben. Dazu wurde in das freipräparierte Gefäß eine feine Kunststoffkanüle (Mikroloader, Eppendorf) oder die abgetrennte Spitze einer Kanüle gelegt. Diese waren über einen feinen Schlauch mit einer Mikroliter-Spritze (Hamilton) verbunden.

### **Isolierung adulter muriner Kardiozyten**

Zur Gewinnung adulter Mauskardiomyozyten wurden Mausherzen ex vivo über die Aorta (sog. Langendorff-Methode) mit einer Kollagenaselösung perfundiert. Zunächst wurden die Mäuse durch Injektion von 50 Einheiten Heparin i.p. heparinisiert. Das Mausherz wurde 30 min später entnommen und die Aorta wurde unter einer Stereolupe freipräpariert. Nun wurde in den Aortenstumpf eine Metallröhrchen (Kanüle mit abgetrennter Spitze und eingefräster Rille 1mm von ihrem Ende entfernt)

eingeführt und der Aortenstumpf über dieser mit einem Faden fixiert. Das Herz wurde nun mit 1 ml Calcium-freier Tyrode perfundiert. Diese wurde wie folgt angesetzt:

|                                  |                             |        |
|----------------------------------|-----------------------------|--------|
| NaCl                             | 140 mM                      | 40.9 g |
| KCl                              | 5.8 mM                      | 2.16 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.5 mM                      | 0.34 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.4 mM                      | 0.36 g |
| MgSO <sub>4</sub>                | 0.9 mM                      | 1.1 g  |
| Glucose                          | 11.1 mM                     | 11g    |
| HEPES                            | 10.0 mM                     | 11.9 g |
| pH 7.1 mit NaOH                  | H <sub>2</sub> O ad 1000 ml |        |

Das Herz wurde nun über die Kanüle an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen und 3 min mit Calcium-freier Tyrode perfundiert. Dies erfolgte Volumen-gesteuert über eine Rollerpumpe. Daraufhin wurde auf Kollagenase-haltige Perfusionslösung umgeschaltet (8 mg Kollagenase (Worthington Typ I) auf 36 ml Ca-freie Tyrode) und 30 min mit dieser perfundiert. Im Abstand von 5 min wurde durch Zugabe von Calciumchloridlösung die Calciumkonzentration um jeweils 20 µM bis zu einer Endkonzentration von 100 µM erhöht. Daraufhin wurde nocheinmal 12 min mit Calcium-freier Tyrode perfundiert. Das Herz wurde nun nach Abtrennen der Vorhöfe in 5 ml der folgenden Lösung mit einer Schere zerkleinert (sog. Kraftbrühe nach Eppenberger)

|                                 |                             |        |
|---------------------------------|-----------------------------|--------|
| Glutaminsäure                   | 50 mM                       | 9.26 g |
| HEPES                           | 20 mM                       | 4.77 g |
| Taurin                          | 20 mM                       | 2.5 g  |
| Glucose                         | 10 mM                       | 2.0 g  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 3 mM                        | 0.74 g |
| EGTA                            | 0.5 mM                      | 0.19 g |
| KCl                             | 30 mM                       | 2.24 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 30 mM                       | 4.08 g |
| KOH-Plätzchen                   | 10 St.                      |        |
| pH 7.3 mit KOH                  | H <sub>2</sub> O ad 1000 ml |        |

Die Lösung wurde nun über 4 Lagen einer Baumwollgaze in ein 50 ml fassendes Reaktionsgefäß filtriert. Dort sedimentierten die Kardiomyozyten für 10 min und das entstandene Pellet wurde in ein frisches Gefäß überführt.

### **Messung von Calciumtransienten in adulten Kardiomyozyten**

Die Beladung der Kardiomyozyten erfolgte mit dem  $\text{Ca}^{2+}$  Indikator Fluo 3-AM (Molecular Probes) für 10 min bei 22°C. Die Zellen wurden daraufhin mit Tyrode-Lösung gewaschen und in einer Superfusionskammer auf dem Tisch eines inversen Mikroskops plaziert (Axiovert 100, Zeiss). Von nun an wurden die Zellen kontinuierlich mit Calcium-haltiger Tyrode-Lösung (1,5 mM Calcium) superfundiert. Die Kardiomyozyten wurden über 2 in die Kammer intergrierte Platinelektroden mit einem Stimulator (Hugo Sachs Elektronik) stimuliert (Impulsdauer 5 ms, Reizstärke 20% über der Auslöseschwelle von geordneten Calciumtransienten). Die Calciumtransienten einzelner Kardiomyozyten wurden mit einer CCD-Videokamera (Myocam, Ionoptix) mit einer Frequenz von 60 Hz aufgenommen. Je 20 Calciumtransienten einer Zelle wurden mit einem dafür geschriebenen Analyseprogramm ausgewertet (Ionoptix).

## **Histologische Methoden**

### **Fixierung von Gewebe**

Die zur Fixierung von Gewebe verwendete Paraformaldehydlösung wurde wie folgt hergestellt: Eine 8% Lösung von Paraformaldehyd in Wasser wurde mit einer 2-fachen PBS-Lösung vermischt und im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Die milchige 4%ige Lösung wurde durch Zugabe einiger Tropfen NaOH geklärt und aliquotiert bei -20°C gelagert. Zur Fixierung von Gewebestücken (max. 100 mg) wurden diese 24-48 Stunden in der 4%igen Paraformaldehydlösung inkubiert und in Paraffin eingebettet.

### **Färbung von Paraffinschnitten mit Pikrinsäure/SiriusRot**

Die auf Objektträger aufgebrauchten Paraffinschnitte (üblicherweise 5 µm dick) wurden zunächst 10 Minuten in Xylol deparaffiniert und über eine Ethanolreihe in Wasser überführt. Die erste Färbelösung bestand aus 1 Teil 1% SiriusRot F3B (Sigma) und 9 Teilen gesättigter Pikrinsäurelösung in  $\text{H}_2\text{O}$ . Nach Färbung der



Schnitte für 30 Minuten erfolgte die Kernfärbung mit Weigert'scher Lösung (1 Teil Hämatoxylin in Ethanol, 1 Teil Weigert-Reagenz B (11,6 g Fe-III-Cl in 1000 ml H<sub>2</sub>O + 10 ml 10% HCl)) für 2 Minuten. Nach erneuter 3 minütiger Färbung mit Pikrinsäure/SiriusRot wurden die Schnitte über eine Alkoholreihe in Xylol gebracht, mit Histokit (Roth) versehen und gedeckelt.

### **Morphometrie kardialer Gewebeschnitte**

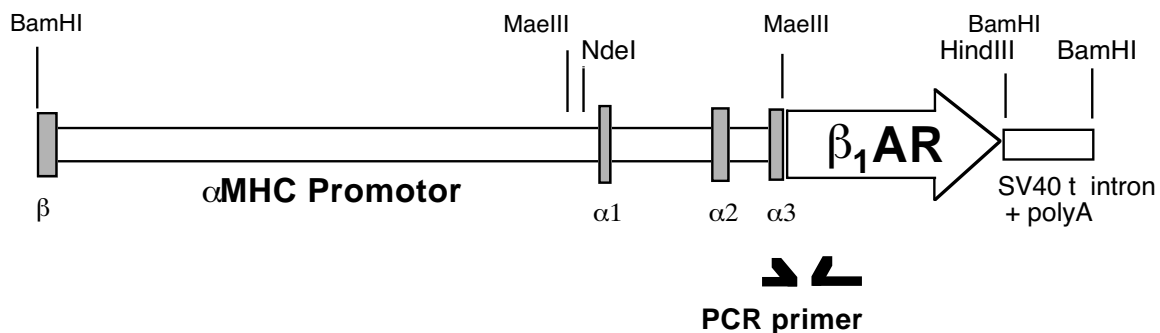
Zur Morphometrie von Kardiocyten wurden 5 µm dicke, mit Hämatoxylin/Eosin gefärbte Schnitte im Mikroskop bei 160facher Vergrößerung fotografiert. Zur Quantifizierung der Kardiocytenquerschnittsfläche wurden 2 alternative Methoden verwendet. Die Diapositive wurden aus konstanter Entfernung projiziert und die Umrisse orthograd getroffener Kardiocyten auf der Ebene der Leinwand auf einem Blatt Papier (80g/m<sup>2</sup>) markiert. Es wurden nur die Umrisse solcher Kardiocyten markiert, die einen mittig angeschnittenen Zellkern zeigten. Die Projektionsfläche der Kardiomyocyten wurde dann ausgeschnitten und gewogen. Alternativ wurden die Schnitte digital fotografiert und die Querschnittsflächen orthograd geschnittener Kardiomyocyten wurden mit einem Bildverarbeitungsprogramm ausgemessen.

## ERGEBNISSE

### Generierung und initiale Charakterisierung $\beta_1$ -transgener Mäuse

#### Konstruktion des Transgenvektors

Für die Herstellung  $\beta_1$ -transgener Mäuse wurde der murine  $\alpha$ MHC-Promotor verwendet. Da der Promotor (vorliegend als Konstrukt  $\alpha$ MHC-AT1a, in dem Plasmid BluescriptKS) an seinem 3'-Ende keine hier verwendbare Schnittstellen aufweist, war eine Zwei-Schritt-Klonierung notwendig. Dazu wurde zunächst die zu exprimierende Sequenz, die des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors (Frielle et al.) an ein 3'-Fragment des  $\alpha$ MHC-Promotors ligiert und dieses Konstrukt dann mit dem verbleibenden 5'-Teil des  $\alpha$ MHC-Promotors verbunden. Abb. 5 zeigt den fertigen Transgenvektor.



**Abb. 5. Transgenes Konstrukt zur Generierung  $\beta_1$ -transgener Mäuse.** Die codierende Sequenz des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors wurde hinter den murinen  $\alpha$ MHC-Promotor kloniert. Zur Verbesserung der Expression ist vor dem PolyA-Signal im 3'-Bereich noch ein Intron eingefügt.

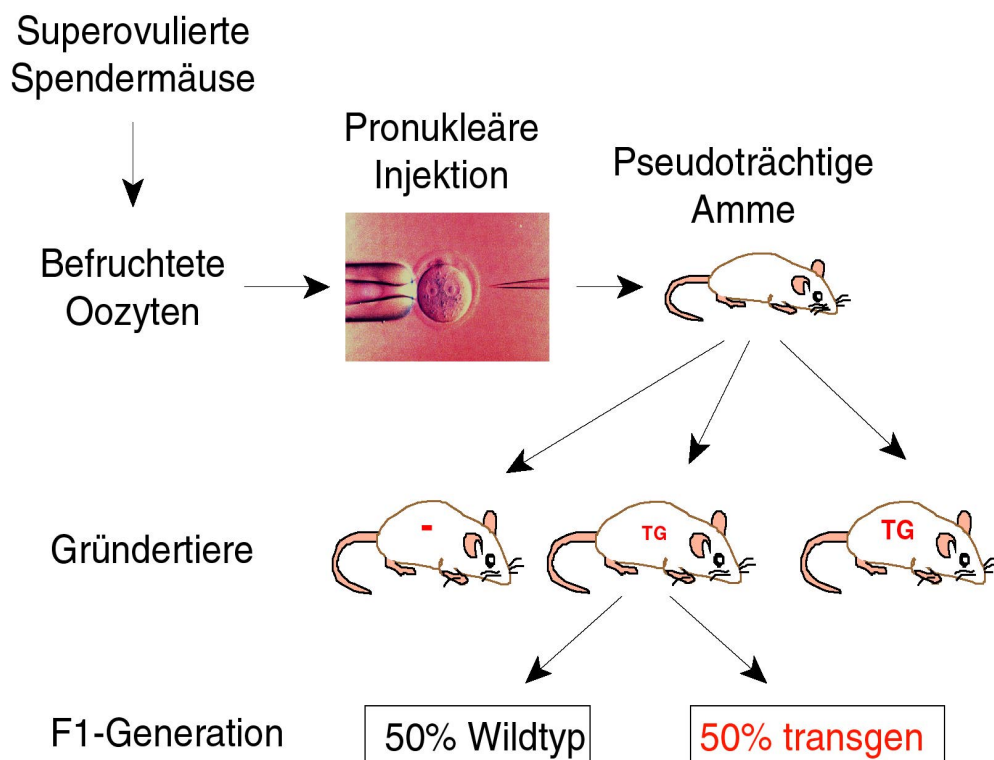
Am Ende des 3'-Bereich des Konstrukts befindet sich ein PolyA-Signal und davor ein dem simian virus 40 (SV40) entstammendes Intron, das der Verbesserung der Expressionsstärke dient. Das Plasmid wurde in *E.coli* (Stamm DH5 $\alpha$ ) transformiert, amplifiziert, gereinigt und mit dem Restriktionsenzym SpeI verdaut. Der resultierende lineare Transgen-Vektor wurde nach Größenfraktionierung auf einem Agaraosegel (1% Low-melting-point Agarose in TAE) aus diesem isoliert. Nach Abschätzung der Konzentration auf einem Agaraosegel (im Vergleich zu definierten Mengen eines

DNA-Längenstandards) wurde die Konzentration des Konstrukts auf 2 ng/ $\mu$ l eingestellt.

### Pronukleäre Injektion und Ovidukttransfer

Am Morgen wurden den superovulierten Weibchen befruchtete Oozyten aus der Ampulle des Ovidukts entnommen und diese kurz mit Hyaluronidase behandelt. Dies geschah durch auf- und abpipettieren in sog. Transferkapillaren (100 $\mu$ m Innendurchmesser). Die Oozyten wurden daraufhin auf einen Objektträger transferiert und unter einem inversen Mikroskop wurde nach Fixierung der Zelle mit einer Haltekapillare einer der Pronuklei aufgesucht. In diesen wurde der Transgenvektor mit einer Injektionskapillare injiziert.

Die injizierten Oozyten wurden sodann mit einer Kapillare aufgesammelt und in den Ovidukt sog. pseudoträchtiger Ammentiere transferiert. Abb. 6 gibt einen Überblick über die beschriebene Technologie.

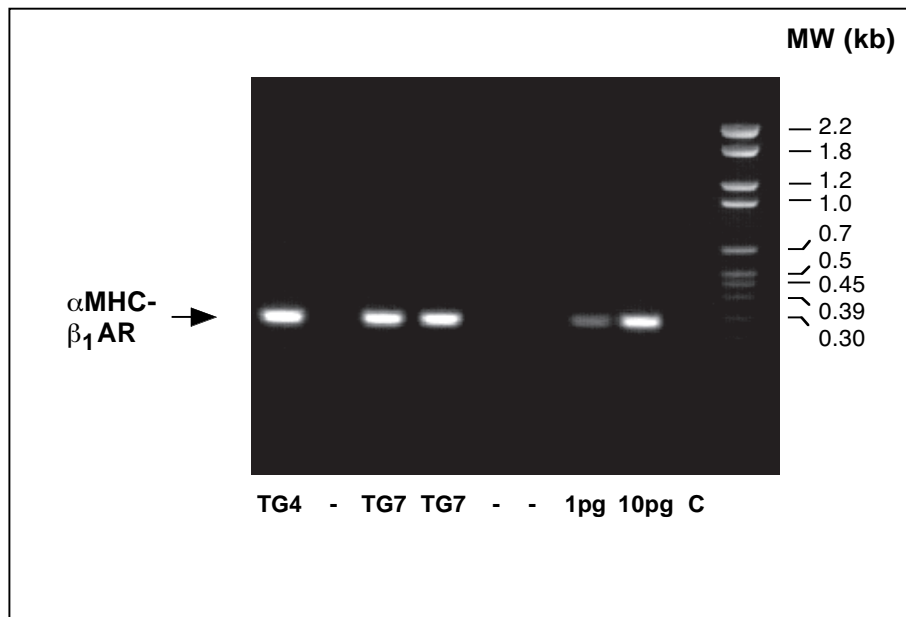


**Abb. 6. Generierung transgener Mäuse durch pronukleäre Injektion.** Nach der Gewinnung befruchteter Eizellen wird das DNA-Konstrukt in den Vorkern dieser Zellen injiziert. Die befruchteten und injizierten Eizellen werden dann in den Eileiter von pseudotrchtigen Ammen-Weibchen eingebracht. Aus diesen Eizellen entwickeln sich bei Integration des transgenen Konstrukts in das Genom der Tiere die sog. Gründertiere. Sofern es Keimbahnüberträger ist, kann jedes dieser Tiere Ausgangspunkt einer eigenen transgenen Linie sein.

### **Screening der geborenen Tiere auf Integration des Transgens**

Die geborenen Tiere der Ammenweibchen wurden mit Hilfe einer PCR-basierten Methode auf die Integration des Transgens in ihr Genom untersucht. Dazu wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien dieser Tiere isoliert und Transgen-spezifische Sequenzen dann mit Hilfe einer PCR-Strategie amplifiziert. Es wurde dazu ein Primer-Paar verwendet, das in Kombination nur in transgenen Tieren ein PCR-Produkt ergibt (Abb. 7).

Die Generierung transgener Tiere erwies sich zunächst als schwierig. Die Würfe der Ammentiere waren klein und es befanden sich keine transgenen Tiere in den Würfen. Dies war nicht auf eine ungenügende Operationstechnik zurückzuführen, da der Transfer von nicht-injizierten Oozyten zur Geburt ausreichend grosser Würfe führte. Die daraufhin versuchte Injektion von Pufferlösung ohne DNA-Konstrukt brachte dann ein überraschendes Ergebnis: Auch hier kam es zur Geburt normal grosser Würfe mit gutem Überleben. Die bislang fehlgeschlagene Generierung transgener Nachkommen mußte also auf toxische Wirkungen der verwendeten Plasmid-DNA beruhen. Folgende Maßnahmen wurden daher zur Abhilfe ergriffen: 1.) Die Plasmid-DNA wurde fortan mit einer Methode isoliert, die wirkungsvoll Pyrogene entfernt, die in konventionellen Präparationen von Plasmid-DNA enthalten sind. 2.) Das Spel-verdaute, lineare Transgen-konstrukt wurde aus dem Agarosegel nicht mehr über die bislang verwendete Affinitätsreinigung über eine Silicamatrix der Firma Bio101, sondern über eine Matrix der Firma Quiagen in Säulenform gereinigt. 3.) Das gereinigte Konstrukt wurde gegen grosse Mengen (zweimal 5l) TE-Puffer dialysiert. Diese Änderungen erhöhten die Überlebenschancen der injizierten Oozyten beträchtlich und führten schon bald zur Identifizierung zweier transgener Tiere (Abb.7).



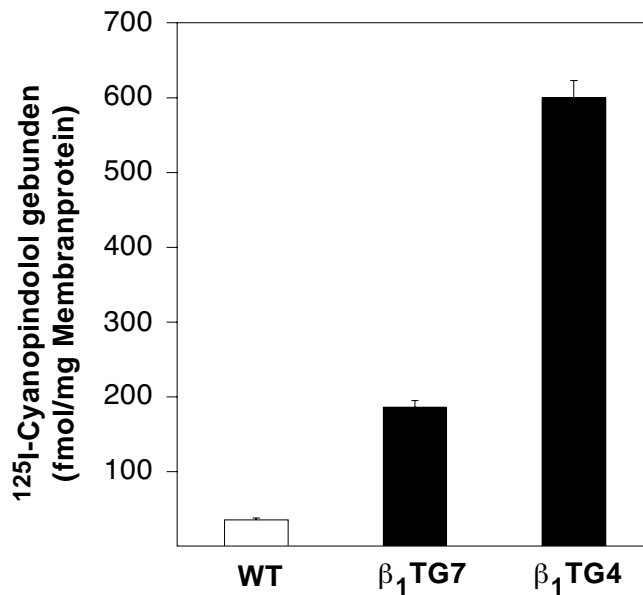
**Abb. 7. PCR-Screening der Nachkommen der Linien  $\beta_1$ TG4 und  $\beta_1$ TG7.** Die Primerkombination ergibt nur bei Vorhandensein des transgenen Konstrukts im Genom eine Bande.

Um zu kontrollieren, daß ein negatives Ergebnis nicht auf eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion aufgrund von ungenügender Menge oder Qualität der DNA-Präparation zurückzuführen ist, wurde eine parallele PCR-Amplifikation eines Kontrollgens, hier des endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorgens durchgeführt.

Die beiden transgenen Tiere der  $F_0$ -Generation erwiesen sich beide als Keimbahnüberträger und waren jeweils Ausgangspunkt einer eigenen transgenen Linie, die mit  $\beta_1$ TG4 und  $\beta_1$ TG7 bezeichnet wurde. Es wurden ausschließlich transgene Tiere untersucht, die heterozygot für das Transgen waren.

### **Bestimmung der Überexpressionsstärke des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors**

Um zu überprüfen, ob das in das Genom der transgenen Tiere integrierte Konstrukt auch zur Expression des Rezeptorproteins in der Zellmembran von Kardiomyozyten führt, wurde zunächst ein Radioligandenbindungsassay durchgeführt. Dazu wurden Herzen von vier Wochen alten transgenen Tieren und Kontrolltieren entnommen, eine Membranfraktion aus diesem Gewebe präpariert und daran die Rezeptordichte mit Hilfe eines Radioligandenbindungsassays bestimmt (Abb. 8).



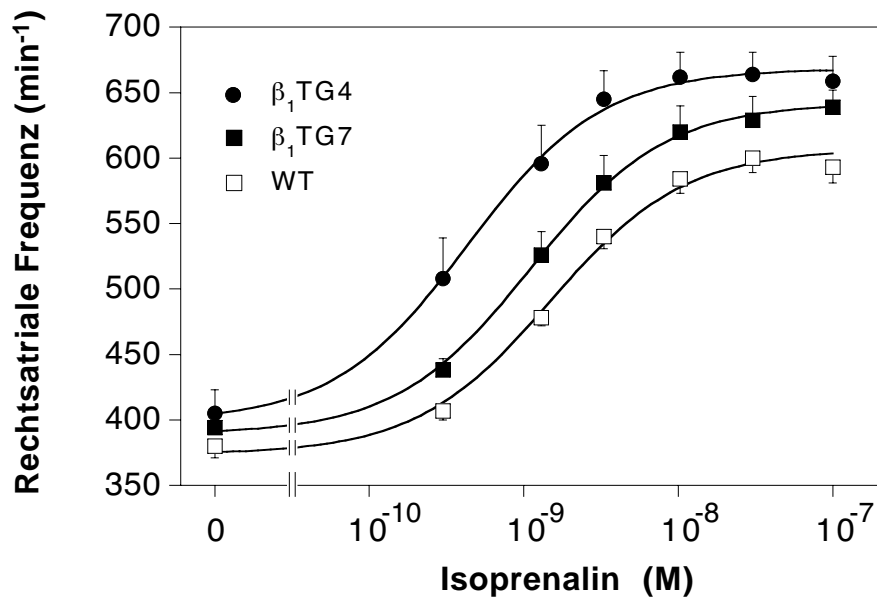
**Abb. 8. Bestimmung der Rezeptordichte mit Hilfe eines Radioligandenbindungsassays.** Herzen von vier Wochen alten Tieren wurden entnommen und eine Membranfraktion daraus präpariert. Jeweils 5 µg Membranprotein wurden mit 300pM [<sup>125</sup>Iod]-Cyanopindolol inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10 µM Propranolol bestimmt.

Aus dieser Bestimmung der Rezeptordichte ergibt sich eine etwa fünffache Überexpression des β<sub>1</sub>-adrenergen Rezeptors in der Linie β<sub>1</sub>TG7 und eine etwa 15-fache Überexpression in der Linie β<sub>1</sub>TG4 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Inzwischen ist klar, daß es in diesen Tieren mit zunehmendem Alter noch zu einer weiteren Erhöhung der Rezeptorexpression kommt. Diese erreicht ihr Maximum in der Linie β<sub>1</sub>TG4 im Alter von 3 Monaten bei etwa 2 pmol/mg Membranprotein.

### **Funktionelle Kopplung der überexprimierten Rezeptoren**

Um zu bestimmen, ob die überexprimierten Rezeptoren auch funktionell gekoppelt sind, wurde die β-Rezeptor-vermittelte Stimulation der Schlagfrequenz von isolierten Vorhöfen untersucht. Dazu wurden rechte Vorhöfe von β<sub>1</sub>-transgenen Tieren und von nicht-transgenen Geschwistertieren isoliert und deren spontane Schlagfrequenz in Organbädern untersucht (Abb. 9). Dabei zeigte sich zunächst, daß es eine, wenn auch relativ kleine, spontane Aktivität des β<sub>1</sub>-adrenergen Rezeptors zu geben scheint: Die unstimulierte Basalfrequenz von Vorhöfen transgener Tiere liegt über der von Wildtyp-tieren. Nach Zugabe des β-Agonisten Isoproterenol zeigte sich jedoch eine deutliche Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für die transgenen

Tiere. Die Linksverschiebung war Gendosis-abhängig, d.h. die höher exprimierenden Tieren zeigten eine stärkere Linksverschiebung der Kurve.

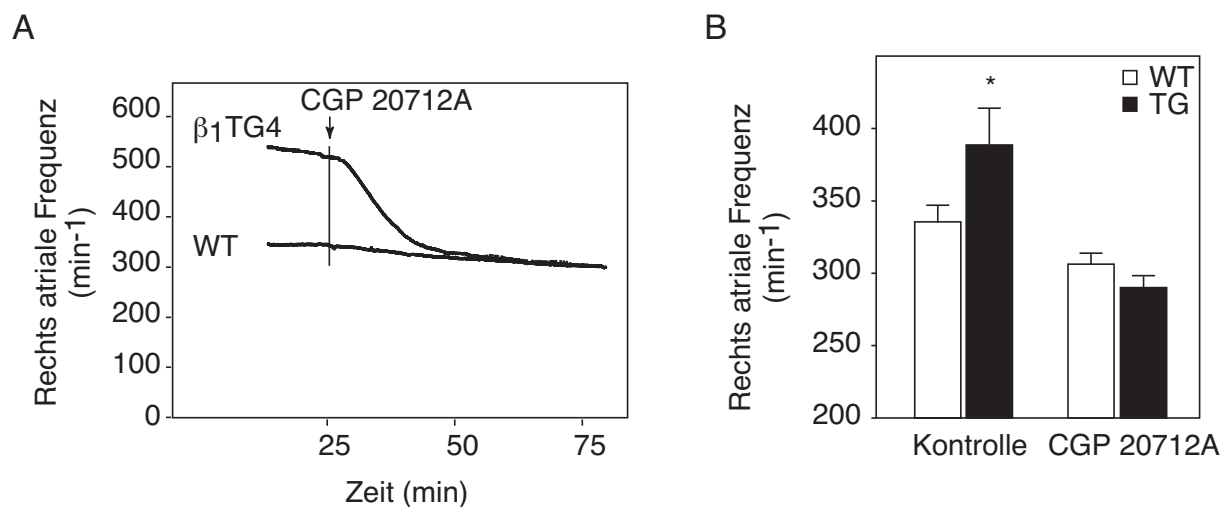


**Abb. 9. Spontane Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe.** Ohne Stimulation mit dem  $\beta$ -Agonisten zeigen die transgenen Vorhöfe nur eine geringe Erhöhung der spontanen Schlagfrequenz (geringe spontane Aktivität der Rezeptoren). Die Applikation des  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol führt zu einer Gendosis-abhängigen Erhöhung der Schlagfrequenz.

## Konstitutive Aktivität des überexprimierten Rezeptors

### Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor ist konstitutiv aktiv

Mit Hilfe des generierten Tiermodells sollte der Frage nachgegangen werden, ob  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren konstitutive Aktivität aufweisen, d.h. ob sie auch in Abwesenheit eines Liganden spontan aktiv sind. Da es sich hier um kleine Effekte handelt ist ein transgenes System mit erhöhten Rezeptordichten notwendig um dieses Phänomen am intakten Organ zu untersuchen. Wir haben deshalb isolierte rechte Vorhöfe von  $\beta_1$ -transgenen Tieren verwendet und ihre spontane Schlagfrequenz im Vergleich zu Vorhöfen von Wildtyp-Geschwistertieren untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Schlagfrequenz in den  $\beta_1$ -transgenen Tieren (Abb. 10). Nach Zugabe des  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten CGP20712A verschwand dieser Unterschied vollständig (Abb. 10).



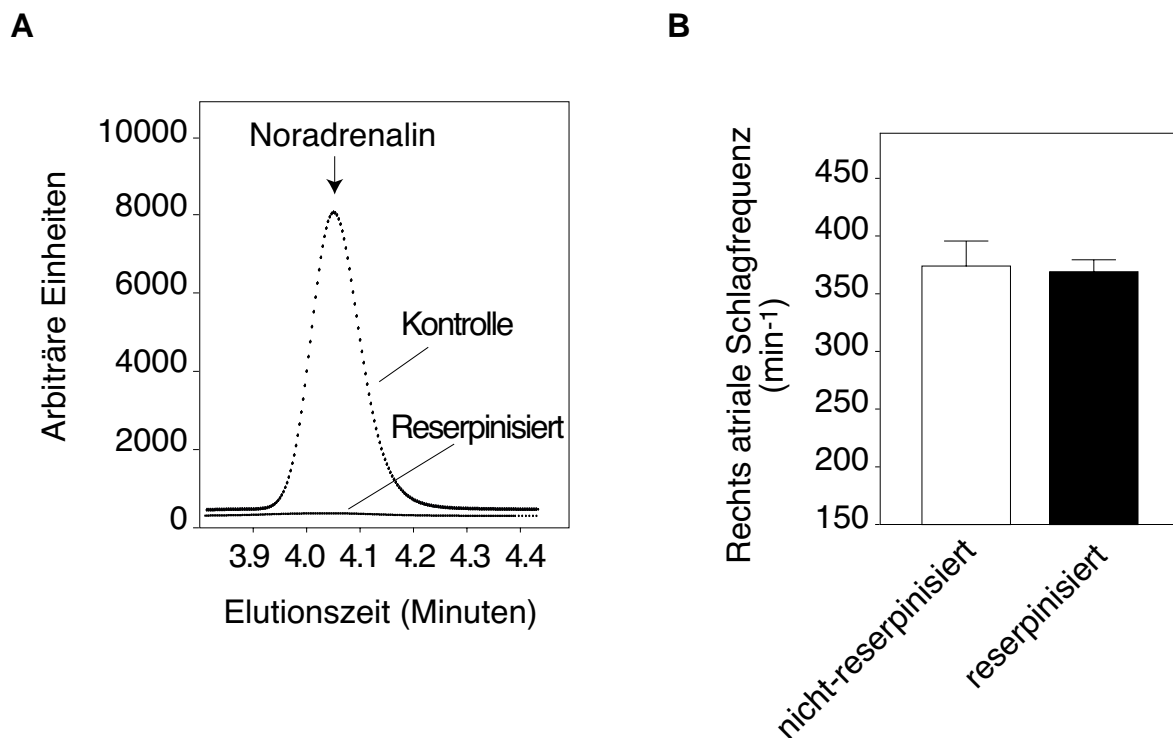
**Abb. 10. CGP20712A hebt die Zunahme der spontanen Schlagfrequenz in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen auf.** (A) Originalregistrierung der Schlagfrequenzen eines  $\beta_1$ -transgenen rechten Vorhofs und der eines Vorhofs von einem Wildtyp-Kontrolltier. (B) Mittelwerte  $\pm$  SF. Die Vorhoffrequenz wurde dabei jeweils vor und 60 min nach Zugabe von 1  $\mu$ M CGP20712A bestimmt.  $p < 0.05$  WT vs. TG.

CGP20712A führte zu einer 25% Abnahme der Schlagfrequenz der transgenen Vorhöfe, aber nur zu einer kleinen Abnahme der Schlagfrequenz von Wildtyp-



Vorhöfen. Dieser Effekt des CGP war durch gleichzeitige Gabe von Propranolol blockierbar.

Nun galt es sicherzustellen, daß die erhöhte Basalfrequenz der transgenen Vorhöfe tatsächlich auf der konstitutiven Aktivität des Rezeptors und nicht auf endogen freigesetzten Katecholaminen beruht. Dazu wurden Tiere mit Reserpin (5mg/kg s.c. 24 Stunden und 2,5mg/kg 3 Stunden vor der Messung) oder Kontrollsubstanz (DMSO) behandelt, um die endogenen Katecholaminspeicher zu entleeren. Die anschließende Analyse mittels HPLC ergab eine Reduktion des Katecholamingehalts im Myokard um 99,9% (Abb. 11A). Die Reserpinbehandlung  $\beta_1$ -transgener Tiere hatte jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Spontanfrequenz isolierter rechter Vorhöfe im Vergleich zu Vorhöfen von nicht-reserpinisierten Tieren (Abb.11B).



**Abb. 11. Die Auswirkungen einer Behandlung mit Reserpin auf den kardialen Noradrenalinegehalt und die rechtsatriale Schlagfrequenz  $\beta_1$ -transgener Vorhöfe.** (A) Zwei repräsentative HPLC-Meßkurven des myokardialen Noradrenalinegehalts von einem reserpinisierten Tier und einem Kontrolltier. (B) Spontane Schlagfrequenz rechter Vorhöfe von  $\beta_1$ -transgenen Mäusen mit und ohne Reserpinisierung. Zwischen den beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Dies weist darauf hin, daß unter den verwendeten Meßbedingungen keine signifikanten Mengen endogener Katecholamine vorhanden waren. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SF von 3 unabhängigen Experimenten.

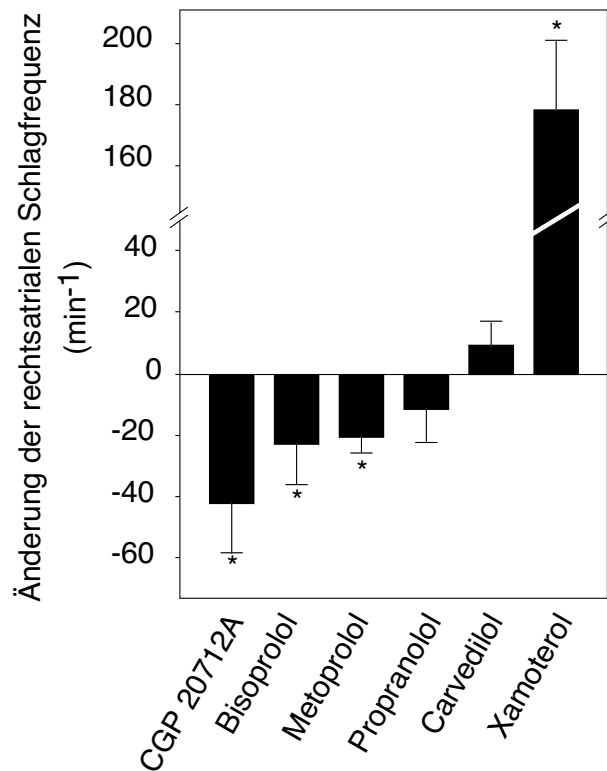
Diese Ergebnisse zeigen, daß die Effekte potentiell vorhandener Spuren endogener Katecholamine vernachlässigbar sind und daß die beobachtete Erhöhung der

Spontanfrequenz isolierter rechter Vorhöfe tatsächlich auf die konstitutive Aktivität der überexprimierten  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren zurückzuführen ist. Da die Reserpinbehandlung keine Auswirkungen auf die Schlagfrequenz der Vorhöfe zeigte, wurden alle weiteren Experimente mit einem intensiven Waschvorgang (siehe unter Methoden), jedoch ohne Reserpinisierung durchgeführt.

### **Unterschiedliche Beeinflussung der konstitutiven Aktivität durch klinisch eingesetzte $\beta$ -Rezeptorantagonisten**

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor spontan aktiv ist und daß sich das von uns generierte Tiermodell dazu eignet die invers agonistischen Eigenschaften von  $\beta$ -Rezeptorantagonisten in einem physiologischen Modell zu untersuchen.

Dieses Tiermodell wurde nun dazu verwendet, verschiedene klinisch eingesetzte  $\beta$ -Blocker hinsichtlich ihrer invers agonistischen Wirkung auf den humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor zu vergleichen (Abb. 12).

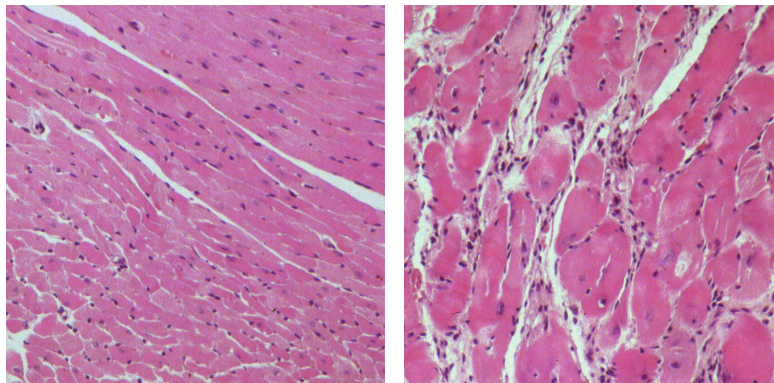


**Abb.12. Invers agonistische Aktivität verschiedener  $\beta$ -Rezeptorantagonisten.** Klinisch eingesetzte  $\beta$ -Rezeptorblocker unterscheiden sich in ihrer invers agonistischen Wirkung am  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SF von 5-12 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ .

Die  $\beta_1$ -selektiven Substanzen CGP20712A, Bisoprolol und Metoprolol zeigten invers agonistische Aktivität. Propranolol führte lediglich zu einem kleinen, nicht signifikanten Abfall der spontanen Schlagfrequenz. Der nicht-selektive  $\beta$ -Blocker Carvedilol zeigte keine invers agonistische Aktivität. Xamoterol schließlichiel sich als partieller Agonist, der zu einem Anstieg der rechtsatrialen Frequenz um 178 Schläge pro Minute führte.

## Kardiale Hypertrophie und Fibrose in $\beta_1$ -transgenen Mäusen

Um die Auswirkungen der in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen vorliegenden chronischen Stimulation von kardialen  $\beta_1$ -Rezeptoren auf das Myokard zu untersuchen, wurde dieses zunächst histologisch untersucht. Dazu wurden Herzen von Tieren in verschiedenen Altersstufen entnommen und in PBS-gepuffertem Paraformaldehyd fixiert. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und geschnitten. 5  $\mu\text{m}$ -Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt um die Größe der Kardiomyozyten zu analysieren und die Kernmorphologie zu beurteilen (Abb. 13).

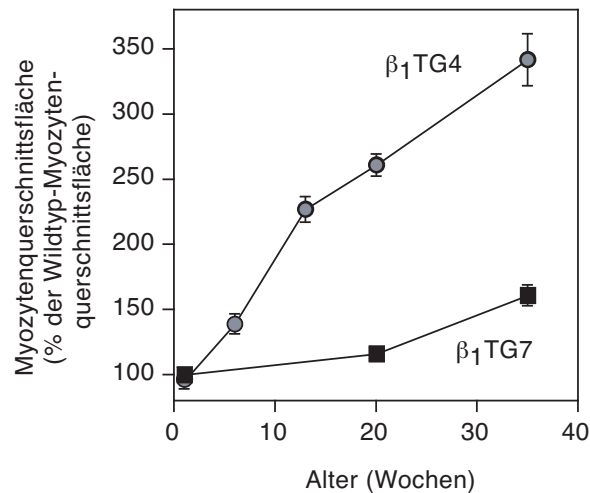


**Wildtyp**

**$\beta_1$ -Transgen**

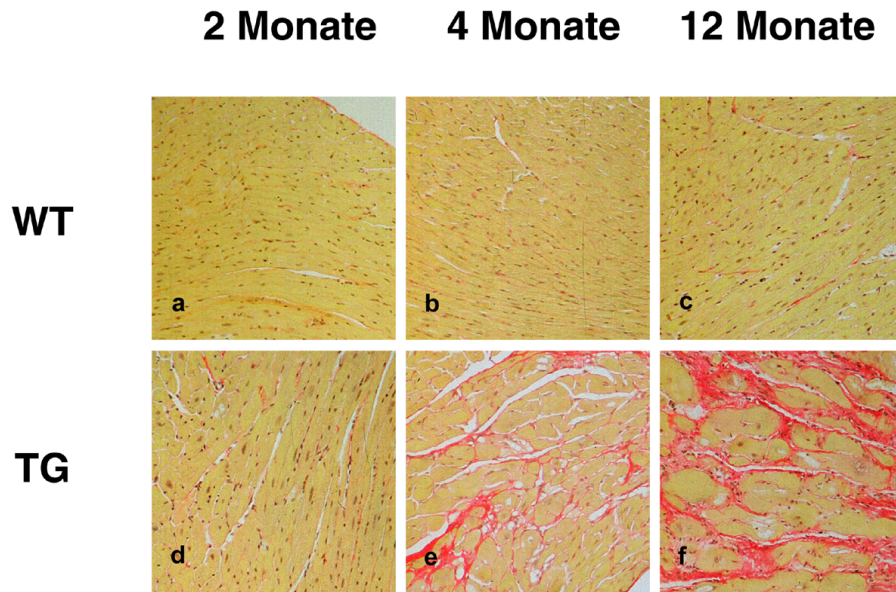
**Abb. 13. HE-Färbung von linksventrikulärem Myokard.** 5  $\mu\text{m}$  dicke linksventrikuläre Schnitte von einem  $\beta_1$ -transgenen Tier der Linie TG4 und eines Wildtyps wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt.

Es zeigten sich zwei deutliche Veränderungen in den transgenen Tieren: 1) Es liegt eine ausgeprägte Hypertrophie von Kardiomyozyten vor. 2) Es kommt zu einer Vermehrung von interstitiellem Bindegewebe. Zunächst wurde die Hypertrophie des Myokards näher untersucht. Dazu wurde in Paraffinschnitten von Tieren verschiedener Altersgruppen morphometrisch die Querschnittsflächen von Kardiomyozyten ausgemessen (Abb. 14).



**Abb. 14. Progressive Hypertrophie linksventrikulärer Kardiomyozyten.** Paraffinschnitte linksventrikulären Myokards wurden HE-gefärbt und die Querschnittsflächen orthograd geschnittener Kardiomyozyten morphometrisch quantifiziert. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist altersabhängig und abhängig von der Stärke der Rezeptorexpression.

Dabei zeigte sich eine progressive Hypertrophie linksventrikulärer Kardiomyozyten bis hin zu einer Verdreifachung der Querschnittsfläche in älteren transgenen Tieren der Linie TG4. Tiere der Linie TG7 zeigten ebenfalls eine hypertrophe Antwort, die jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt war. Zudem fiel in alten Tieren der hochexprimierenden Linie TG4 eine Vermehrung von interstitiellem Bindegewebe auf. Dies wurde mit Hilfe einer Pikrinsäure/Sirius Rot-Färbung näher untersucht. Dazu wurden Gewebeproben von  $\beta_1$ -transgenen und Wildtyp-Tieren in drei verschiedenen Altersklassen gefärbt (Abb. 15).



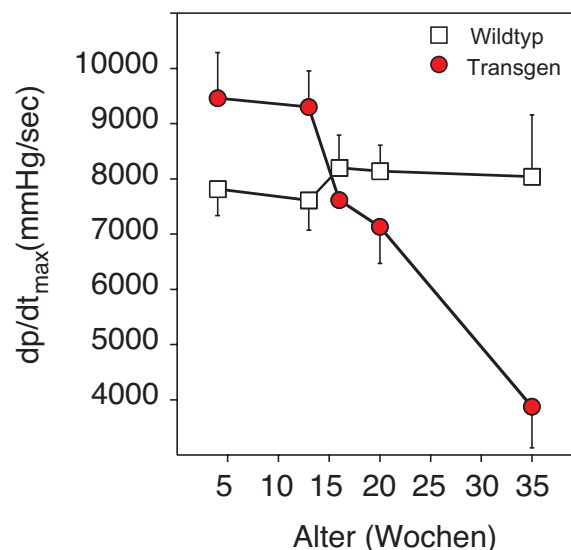
**Abb. 15. Interstitielle Fibrose in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.** 5 $\mu$ m dicke Paraffinschnitte aus dem linken Ventrikel  $\beta_1$ -transgener (d-f) und Wildtyp-Mäuse (a-c) wurde mit Pikrinsäure/Sirius Rot gefärbt. Kardiomyozyten sind gelb, Zellkerne bräunlich und kollagenes Bindegewebe ist rot gefärbt.

In den transgenen Tieren tritt etwa ab dem Alter von 3 Monaten zunächst fokal eine interstitielle Fibrose auf, die jedoch mit zunehmendem Alter der Tiere weiter fortschreitet und schließlich das gesamte linksventrikuläre Myokard durchzieht.

## $\beta_1$ -Transgene Mäuse entwickeln eine Herzinsuffizienz

### Untersuchung der Herzkontraktilität mit einem Linksherzkatheter

Welche Konsequenzen hat die chronische Aktivierung kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und die damit einhergehende Hypertrophie und Fibrose für die Funktion des Herzens? Die Herzfunktion wurde dazu zunächst mit Hilfe einer linksventrikulären Katheterisierung untersucht. Dazu wurden die Tiere mit Tribromethanol i.p. anästhesiert. Nach Freipräparation der rechten A. carotis wurde über diese ein Katheter mit einem miniaturisiertem Druckaufnehmer an der Spitze in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Drucksignale werden dabei während der Platzierung des Katheters auf dem Bildschirm verfolgt. Anhand des charakteristischen Verlaufs der linksventrikulären Druckkurve wird die korrekte Position der Katheterspitze bestimmt. Aus der linksventrikulären Druckkurve wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels berechnet (Abb. 16).



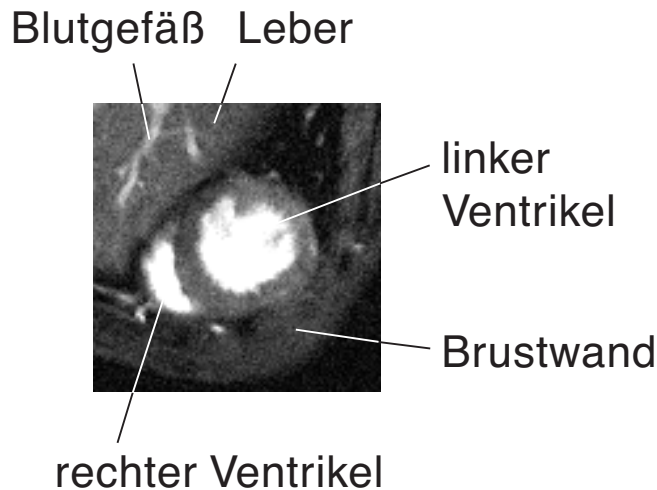
**Abb. 16. Progressiver Verlust der linksventrikulären Kontraktilität in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.**  $\beta_1$ -Transgene Mäuse (●) und Wildtyp-Mäuse (□) verschiedener Altersstufen wurden linksventrikulär katheterisiert. Aus dem Verlauf der Druckkurve wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  ermittelt, die als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität dient.

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, führt die chronische Aktivierung kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren nur zu einer kurzzeitigen Verbesserung der linksventrikulären Funktion. Bereits im Alter von 4 Monaten ist es zum Verlust der initialen Erhöhung der Kontraktilität gekommen. Darauf folgt eine weitere Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion bis hin zu sehr niedrigen Werten um 2000 mmHg/sec.

### **Bestimmung der Kinetik der kardialen Volumina mit Hilfe der Kernspintomographie**

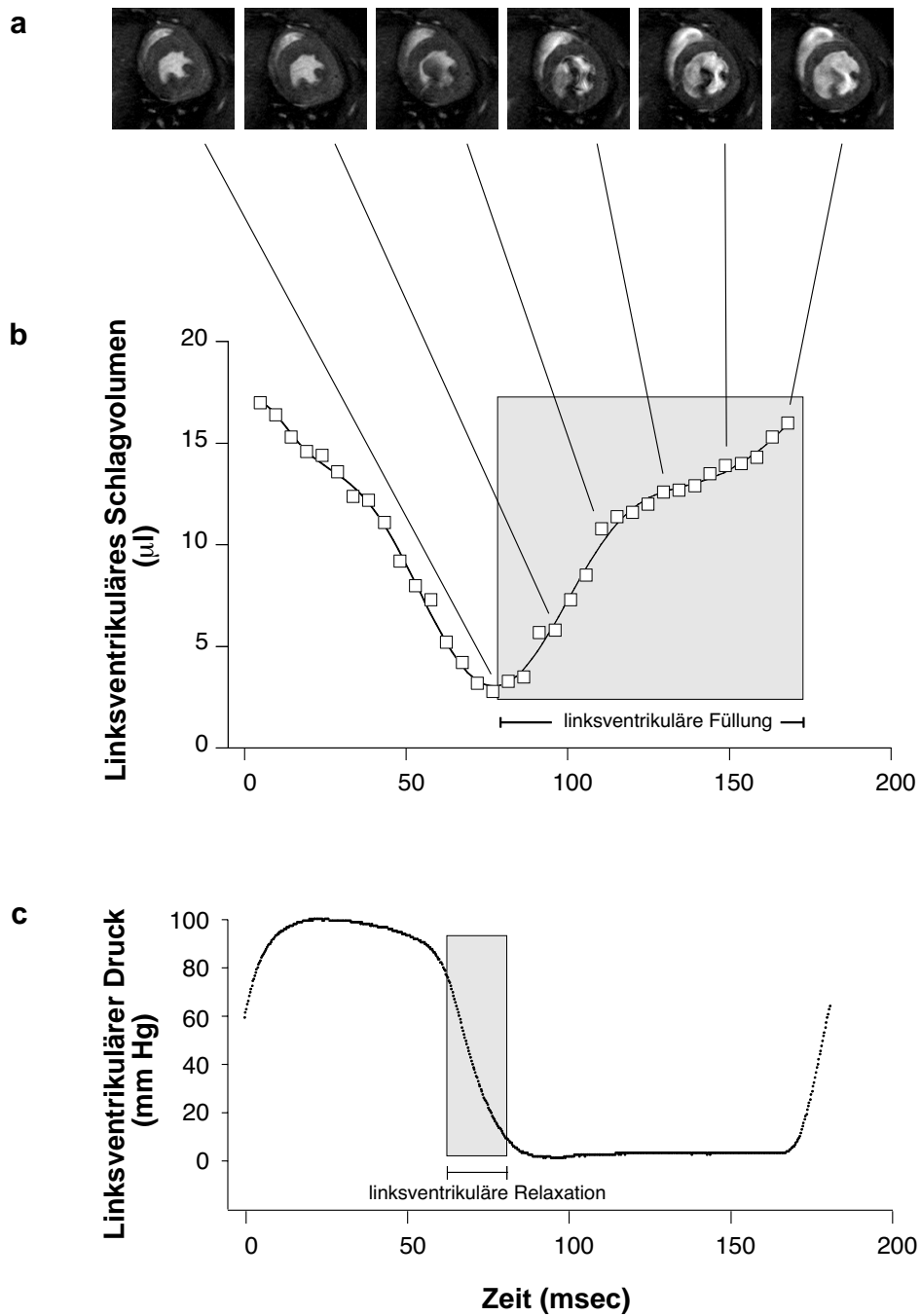
Läßt sich die Linksherzkatheterisierung mittlerweile auch zügig und weitgehend problemlos durchführen, so erlaubt sie jedoch keine Aussagen über die Volumenänderung des linken Ventrikels im Verlauf einer Herzaktion. Um für die Charakterisierung einer Herzinsuffizienz so zentrale Parameter wie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zu erhalten, wurde ein bildgebendes Verfahren eingesetzt. Dies war durch eine Kooperation mit dem Institut für Biophysik in Würzburg möglich. Dort wurde in den vergangenen Jahren ein sowohl zeitlich als auch räumlich sehr hoch auflösendes NMR-basiertes Bildgebungsverfahren für die Anwendung am lebenden Organismus entwickelt. Die präzise Darstellung wird dabei durch Aufsummation von Einzelbildern erreicht, die jeweils EKG-getriggert und damit zu definierten Zeitpunkten während einer Herzaktion aufgenommen werden. Die Maus ist während der Messung anaesthetisiert. Mit dieser Technik ist es möglich eine Ortsauflösung von 100  $\mu\text{m}$  zu erreichen und einen Bildwiederholungsabstand von nur 8 ms. Die Ebene, in der Bilder des schlagenden Herzens aufgenommen werden, wird dabei so eingestellt, daß die eigentliche Messung schließlich in der sog. kurzen Achse erfolgen kann, die einem Querschnitt durch beide Kammern entspricht (Abb. 17).





**Abb. 17. NMR-Bild eines schlagenden Mauseherzens.** Nach Anaesthetie mit Isofluran werden EKG-getriggert NMR-Bilder in der sog. kurzen Achse des Herzens aufgenommen. Deutlich erkennbar sind das Lumen des linken und des rechten Ventrikels, die Ventrikelwände und Details benachbarter Organe, wie z.B. die Leber mit Gefäßen. Die räumliche Auflösung beträgt  $100\ \mu\text{m}$ .

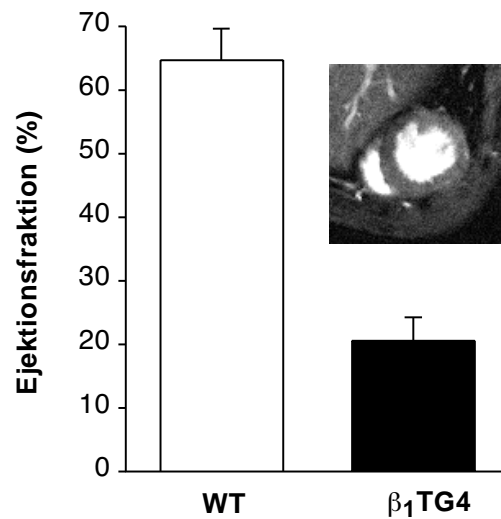
Die Frequenz der Bildaquisition lässt sich dabei bis auf 8 ms erhöhen. Damit ist auch bei einer Schlagfrequenz des Mauseherzens von 400-500 Schlägen/min eine präzise Erfassung der Kinetik der Volumenänderung möglich. Aus den einzelnen Schnittbildern in der kurzen Achse (Schnittdicke 1mm) lässt sich das Volumen eines solchen Schnittes genau berechnen (Abb. 18).



**Abb. 18. Erfassung der Kinetik der linksventrikulären Volumenänderung mit Hilfe der bildgebenden Kernspintomographie.** Eine vier Monate alte Maus wurde unter Isoflurannarkose in einem experimentellen 7,2T-Kernspintomographen der Firma Bruker untersucht. Die Bildaquisition erfolgte dabei EKG-getriggert, der Bildabstand betrug 8 ms. Aus den einzelnen Schichtbildern wurde das Schichtvolumen berechnet (Schichtdicke 1 mm) und über die Zeit aufgetragen.

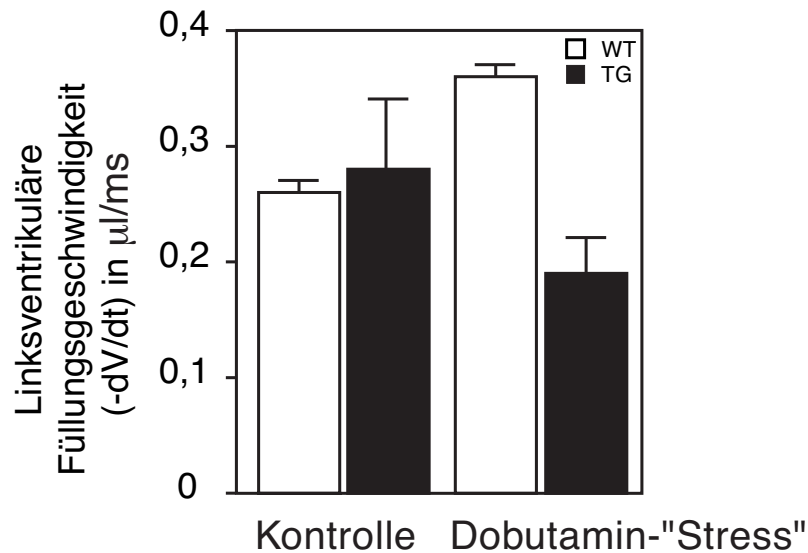
Aus diesen Messungen ergaben sich zwei wesentliche Befunde: Aus dem Vergleich endsystolischer und enddiastolischer Schichtbilder lässt sich der Anteil des während einer Herzaktion ausgeworfenen Volumenanteils berechnen. In alten  $\beta_1$ -transgenen

Tieren kommt es zu einer deutlichen Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Abb. 19).



**Abb. 19. Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.** Elf Monate alte männliche  $\beta_1$ -transgene Mäuse und Wildtyp-Tiere wurden unter Isoflurannarkose mit Hilfe der bildgebenden Kernspintomographie untersucht. Die Tiere zeigten eine deutliche Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion in einer Größenordnung wie sie auch für die humane Herzinsuffizienz charakteristisch ist.

Im Alter von drei Monaten waren diese Tiere noch unauffällig hinsichtlich ihrer Ejektionsfraktion als auch hinsichtlich aller weiteren erfassten Parameter. Wurde jetzt jedoch versucht, die Herzleistung durch Applikation des  $\beta$ -Agonisten Dobutamin zu steigern, so kam es in den Wildtyptieren zu der erwarteten Steigerung der Entleerungs- und der Füllungsgeschwindigkeit, in den transgenen Tieren blieb diese jedoch bereits vollständig aus (Abb. 20).

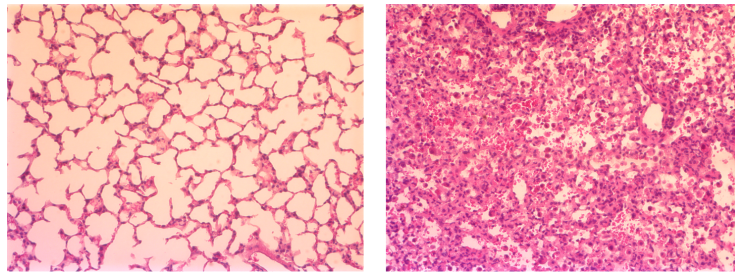


**Abb. 20. Bestimmung der maximalen Füllungsgeschwindigkeit des linken Ventrikels mit und ohne Stimulation der Herzfunktion mit Dobutamin.** Im Alter von drei Monaten ergab die Bestimmung der Herzfunktion von  $\beta_1$ -transgenen Mäusen noch weitgehend unauffällige Werte. Erst die Applikation des  $\beta$ -Agonisten Dobutamin demaskiert die bereits latente Störung der Herzfunktion: Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren ist in den transgenen Tieren keine weitere Steigerung der Füllungsgeschwindigkeit möglich.

Mit der Hilfe dieser Methodik ist es also möglich ähnlich wie es am Patienten mit dem sog. „Dobutamin-Stress-Echo“ praktiziert wird, eine latente Funktionsstörung zu demaskieren.

### Das klinische Bild einer Herzinsuffizienz in $\beta_1$ -transgenen Mäusen

Zwischen einem Alter von 10 und 13 Monaten entwickeln  $\beta_1$ -transgene Tiere mit hoher Rezeptorüberexpression (TG4) klinische Anzeichen einer Herzinsuffizienz. So kommt es bei diesen Tieren zu einer Vergrößerung der Ventrikel im Sinne einer Dilatation. Zudem werden die Tiere zunehmend kachektisch und entwickeln eine Stauungssymptomatik, die als Stauung der Lunge und als Pleuraerguß imponiert. Dabei sind männliche Tiere etwa zwei Monate früher als weibliche Tiere von diesen klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz betroffen. Abb. 21 zeigt das histologische Bild einer Stauungslunge, wie sie bei allen älteren  $\beta_1$ -transgenen Tieren auftritt.



Wildtyp

 $\beta_1$ -Transgen

**Abb. 21. Stauungslunge in einem 12 Monate alten  $\beta_1$ -transgenen Tier neben der unauffälligen Lunge eines nicht-transgenen Geschwistertieres.** Es zeigt sich das Bild einer chronischen Stauungsinduration mit Verdickung der Alveolarsepten. Färbung der Gewebeschnitte mit Hämotoxylin/Eosin.

Die chronische Aktivierung kardialer  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren führt also zu progressiver Kardiomyozytenhypertrophie, gefolgt von interstitieller Fibrose und schließlich zum klinischen Bild einer Herzinsuffizienz.

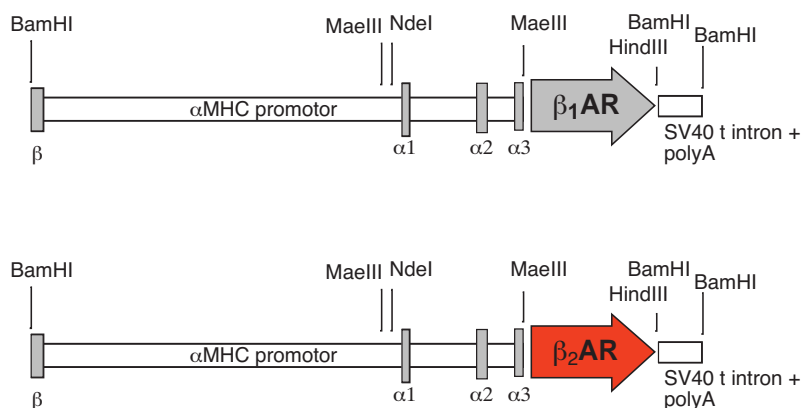
## $\beta_1$ -Transgene Mäuse und $\beta_2$ -transgene Mäuse zeigen unterschiedliche Phänotypen

Interessanterweise ist für  $\beta_2$ -transgene Mäuse, die den humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor kardial überexprimieren eine langdauernde Erhöhung der kardialen Kontraktilität beschrieben (Milano et al., 1994). Dies steht in deutlichem Gegensatz zu den hier für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor erhobenen Befunden. Um herauszufinden, ob es tatsächlich Unterschiede im Phänotyp nach chronischer Aktivierung der beiden Rezeptorsubtypen gibt, haben wir den Phänotyp beider Mausmodelle parallel untersucht und daraufhin nach Unterschieden in der intrazellulären Signaltransduktion dieser beiden Subtypen gesucht.

### Für die Generierung von $\beta_1$ - und $\beta_2$ -transgenen Mäusen verwendete Transgenkonstrukte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben den schon beschriebenen  $\beta_1$ -transgenen Linien eine  $\beta_2$ -transgene Mauslinie verwendet, die bereits ausführlich in der Literatur beschrieben wurde (Milano et al., 1994) und uns freundlicherweise von Robert Lefkowitz und Mitarbeitern zur Verfügung gestellt wurde.

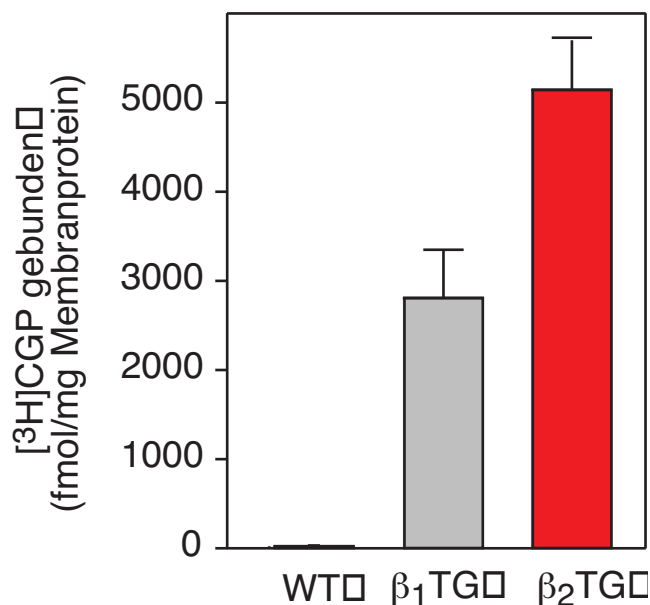
Zur Generierung dieser Tiere wurde das gleiche Fragment des murinen  $\alpha$ MHC-Promotors verwendet und in beiden Tieren wurde die humane Form des jeweiligen Subtyps überexprimiert. Abb. 22 stellt die beiden Konstrukte gegenüber.



**Abb. 22. DNA-Konstrukte zur Generierung der beiden transgenen Linien  $\beta_1$ TG4 und  $\beta_2$ TG4.** Für beide Linien wurde der gleiche Promotor und das humane Homolog des jeweiligen Rezeptorsubtyps verwendet.

### Expressionsstärke der beiden transgenen Linien

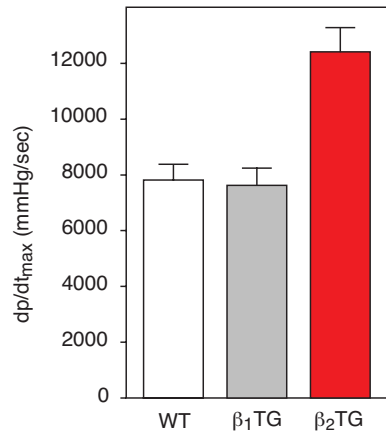
Entscheidend für einen sinnvollen Vergleich der Phänotypen der beiden transgenen Linien ist eine vergleichbare Rezeptorexpression. Dazu wurde ein Radioligandenbindungsassay an einer myokardialen Membranfraktion von 4 Monate Tieren durchgeführt. Die  $\beta_2$ -transgenen Tiere wiesen dabei eine höhere, jedoch noch vergleichbare Expressionsstärke im Vergleich zu den  $\beta_1$ -transgenen Tieren auf (Abb.23).



**Abb. 23. Expressionsstärke des überexprimierten Rezeptorsubtyps in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -transgenen Mäusen.** Die Rezeptordichte wurde an Herzmembranen von jeweils 4 Monate alten Tieren mit Hilfe eines Radioliganden-Bindungsassays bestimmt.

### Vergleichende Untersuchung der kardialen Kontraktilität

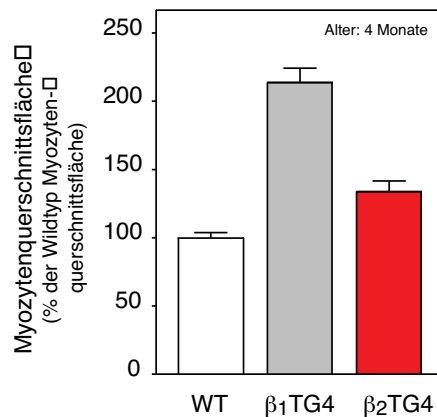
Die Tiere wurden nun, wie für die  $\beta_1$ -transgenen Tiere beschrieben, linksventrikulär katheterisiert. Dabei zeigte sich, daß es in den  $\beta_2$ -transgenen Tieren zu einer langanhaltenden Erhöhung der linksventrikulären Kontraktilität kommt. Dies steht im Gegensatz zu den  $\beta_1$ -transgenen Tieren, bei denen es in diesem Alter bereits zu einem Rückgang der initial erhöhten Kontraktilität auf Wildtyp-Niveau gekommen ist (Abb. 24).



**Abb. 24. Vergleichende linksventrikuläre Katheterisierung β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-transgener Mäuse.** Es wurden jeweils 4 Monate alte Tiere untersucht. Narkose mit Tribromethanol intraperitoneal.

### Unterschiedlich starke Hypertrophie nach Überexpression der beiden Rezeptor-Subtypen

Um zu überprüfen ob die unterschiedliche Kontraktilität ein morphologisches Korrelat hat, wurde zunächst die Hypertrophieentwicklung in den beiden transgenen Linien im Vergleich untersucht. Dazu wurde die durchschnittliche Kardiomyozyten-Querschnittsfläche aus mehr als 100 morphometrisch vermessenen Zellen pro Gruppe bestimmt (Abb. 25). Dabei zeigte sich daß es in den β<sub>2</sub>-transgenen Tieren, trotz ihrer etwas höheren Rezeptorexpression und ihrer deutlich höheren Kontraktilität zu einer nur geringen Hypertrophieentwicklung kommt. Im Vergleich dazu kam es in den β<sub>1</sub>-transgenen Tieren zu einer sehr deutlich ausgeprägten Hypertrophie mit mehr als einer Verdoppelung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche.

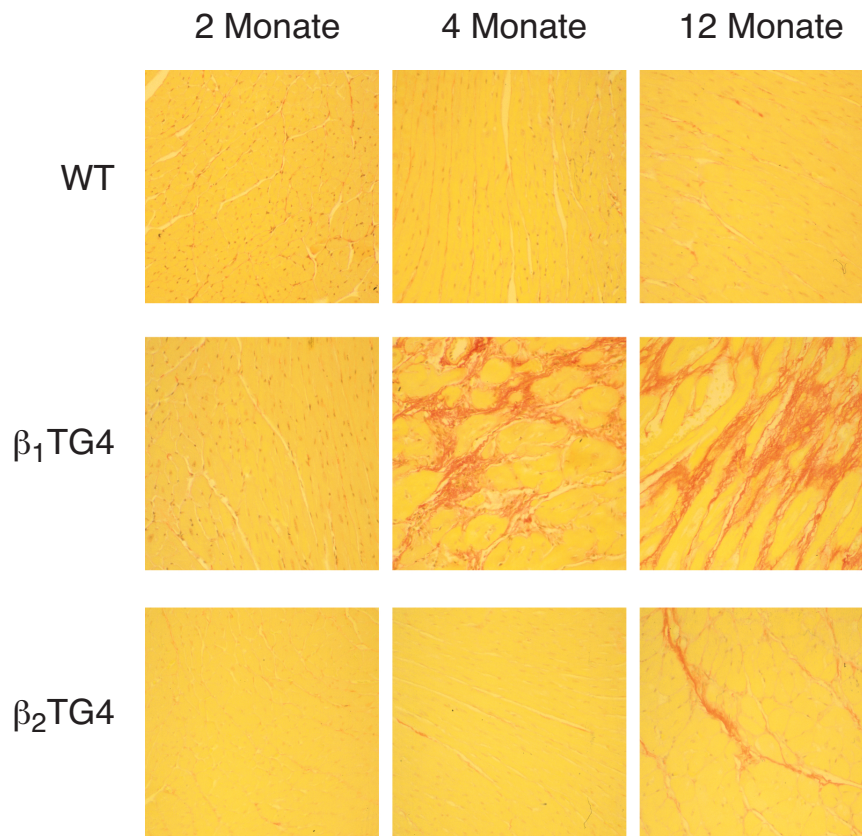


**Abb. 25. Hypertrophieentwicklung in β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-transgenen Mäusen.** Dargestellt ist der durchschnittliche Kardiomyozytenquerschnitt aus dem linksventrikulären Myokard β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-transgener Mäuse im Alter von 4 Monaten.



### Unterschiedliche Entwicklung der interstitiellen Fibrose

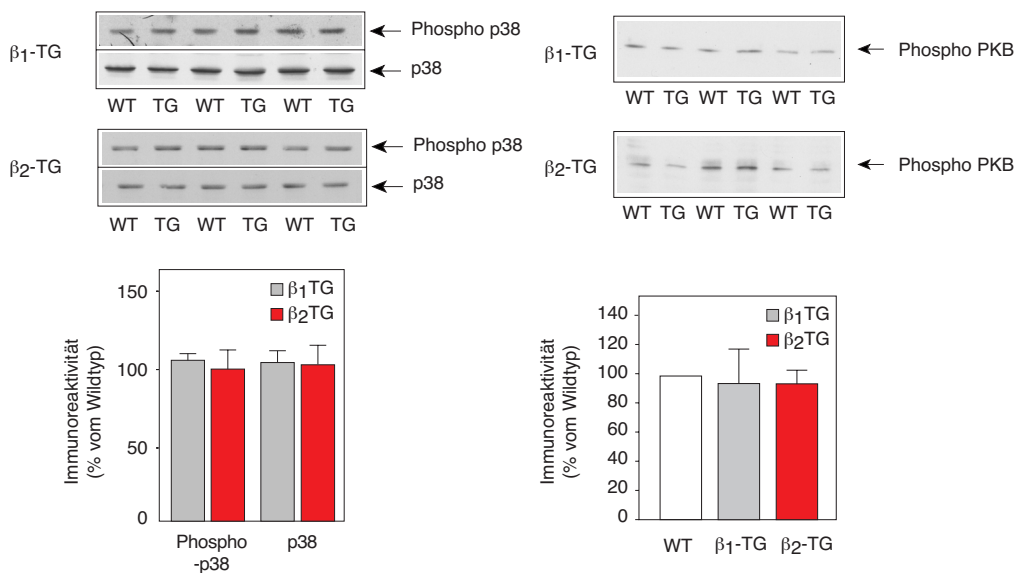
Auch der zweite wesentliche morphologische Parameter des Phänotyps  $\beta_1$ -transgener Mäuse, die interstitielle Fibrose, zeigt in den  $\beta_2$ -Rezeptor überexprimierenden Tieren eine wesentlich mildere Ausprägung: Bei 4 Monate alten  $\beta_2$ -transgenen Mäusen war keinerlei interstitielle Fibrose nachweisbar. Erst in sehr alten  $\beta_2$ -transgenen Tieren war eine im Vergleich zu  $\beta_1$ -transgenen Tieren nur mäßig ausgeprägte interstitielle Fibrose nachweisbar (Abb. 26).



**Abb. 26. Unterschiedliche Fibroseentwicklung in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -transgenen Mäusen.** Sirius-Rot-Färbung von linksventrikulärem Myokard von Wildtyp,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -transgenen Mäusen in 3 verschiedenen Altersstufen.

### Unterschiede in der Signaltransduktion der beiden Rezeptorsubtypen $\beta_1$ und $\beta_2$

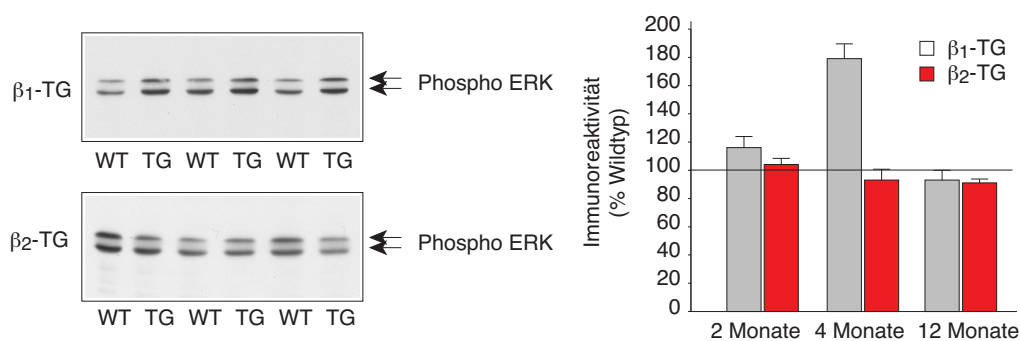
In vitro durchgeführte Studien haben 2 potentielle Unterschiede in der kardialen Signaltransduktion zwischen den beiden Subtypen ergeben:  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, nicht jedoch  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren, sollen die p38 MAP-Kinase (Communal et al., 2000) bzw. die Proteinkinase B (Chesley et al., 2000) aktivieren und darüber Apoptose-protektiv wirken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun der Versuch gemacht werden, diese interessanten Unterschiede auf die in vivo Situation zu übertragen. Als Modelle chronischer Subtyp-spezifischer Rezeptorstimulation wurden die beiden beschriebenen Mausmodelle mit  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -Rezeptor Überexpression verwendet. Die Aktivierung verschiedener Signalwege wurde dabei unter „steady state“-Bedingungen untersucht, d.h. ohne vorherige Stimulation durch Agonisten. Die Untersuchung der beiden als differentiell beschriebenen Signalwege ergab ein zunächst überraschendes Ergebnis: Weder die p38 MAP-Kinase noch die Proteinkinase B zeigten eine verstärkte Aktivierung in den  $\beta_2$ -transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren oder  $\beta_1$ -transgenen Tieren (Abb. 27).



**Abb. 27. Aktivierung und Expression der p38 MAP-Kinase und der Proteinkinase B in  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -transgenen Tieren und in Wildtypieren.** Bestimmung der Aktivität durch Western-Blot mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern. Bestimmung der Proteinexpression mit konventionellen Antikörpern.

Da die bei *in vitro* Experimenten nach Kurzzeitstimulation beschriebenen Veränderungen sich nicht auf die *in vivo* Situation übertragen ließen, wurden nun die übrigen Signalwege der MAP-Kinase-Familie untersucht. Es ergaben sich dabei keine Unterschiede für die jun-Kinase-Aktivierung und ebenfalls keine signifikante Veränderung der p70S6-Kinase Aktivität (nicht gezeigt).

Es fand sich jedoch eine deutlich verstärkte Aktivierung der ERK-Kinase in  $\beta_1$ -transgenen, nicht jedoch in  $\beta_2$ -transgenen Mäusen. Diese als verstärkte Phosphorylierung der ERK-Kinase bestimmte Aktivitätserhöhung war nicht von einer verstärkten Proteinexpression begleitet (Abb. 28).



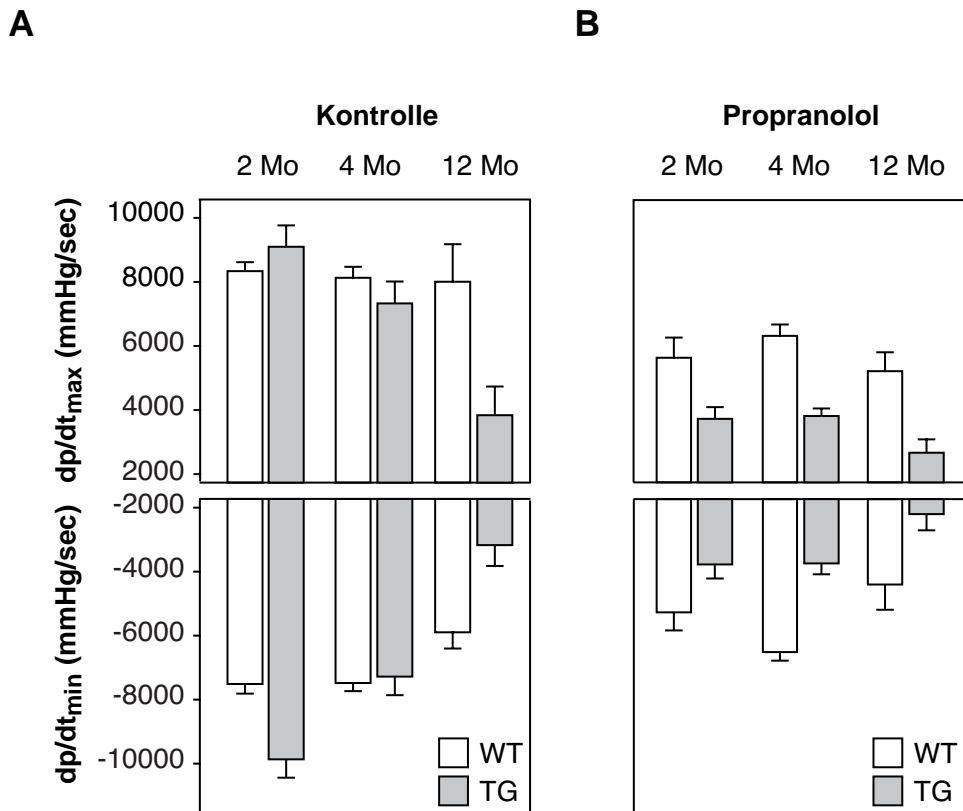
**Abb. 28. Verstärkte ERK-Aktivierung in  $\beta_1$ - nicht jedoch in  $\beta_2$ -transgenen Mäusen.** Bestimmung der Aktivität durch Western-Blot mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern. Die Proteinexpression wurde mit konventionellen Antikörpern bestimmt.

## **Suche nach den Ursachen der $\beta$ -adrenerg induzierten Hypertrophie: Calciumhaushalt**

Die Aktivierung der ERK-Kinase stellt einen potentiellen Mechanismus dar, über den chronische  $\beta_1$ -Rezeptor-Stimulation Hypertrophie von Kardiomyozyten bewirken könnte. Welches sind nun die frühesten morphologischen und funktionellen Veränderungen im Myokard? Bereits im Alter von wenigen Wochen lässt sich eine Größenzunahme der Kardiomyozyten im Sinne einer Hypertrophie feststellen. Als Gesamtorgan ist das Herz in diesem Alter jedoch noch deutlich hyperkontraktile. Es stellte sich nun die Frage, ob die Aktivierung der überexprimierten  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren während der Bestimmung der linksventrikulären Kontraktilität nicht eine evtl. schon in früherem Alter auftretende Beeinträchtigung der linksventrikulären Kontraktilität maskiert.

### **Bestimmung der linksventrikulären Kontraktilität unter gleichzeitiger $\beta$ -Blockade**

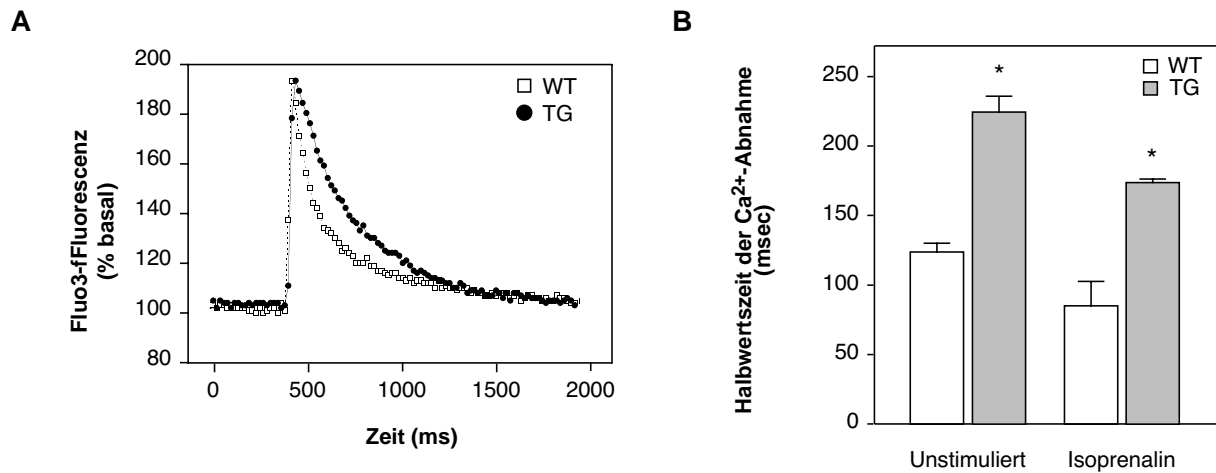
Um die potentielle Maskierung einer frühen Kontraktilitätsstörung zu verhindern, wurde nun im Verlauf der Messung Propranolol ( $1 \mu\text{g/g}$  Körpergewicht langsam i.v.) verabreicht. Dies führte in allen Tieren zu einer Abnahme der Herzfrequenz und der linksventrikulären Kontraktilität und Relaxation als Ausdruck einer vorhandenen sympathischen Stimulation. Während diese Abnahme der Kontraktilität und Relaxation in den Wildtyp-Tieren moderat ausfiel (Abb. 29 B), kam es in den transgenen Tieren bereits im Alter von 8 Wochen zu einer deutlichen Einschränkung der linksventrikulären Kontraktilität.



**Abb. 29. Die Gabe von Propranolol demaskiert eine bereits frühzeitig auftretende Störung der linksventrikulären Funktion.** Maximale Geschwindigkeit des linksventrikulären Druckanstiegs ( $dp/dt_{max}$ ) und -abfalls ( $dp/dt_{min}$ ) ohne (A) und mit (B) Behandlung mit Propranolol.

### Messung intrazellulärer Calciumtransienten in Kardiomyozyten

Aus Studien an menschlichen Kardiomyozyten ist bekannt, daß Beeinträchtigungen der Kontraktilität und der Relaxation Ausdruck eines gestörten intrazellulären Calciumtransienten sein können. Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus in dem von uns generierten Tiermodell existiert, wurden Kardiomyozyten aus den Herzen junger 8 Wochen alter Mäuse präpariert und in diesen die Kinetik des zellulären Calciumtransienten bestimmt. Die Kardiomyozyten wurden dazu mit dem Calciumindikator Fluo3-AM beladen und mit einer Frequenz von 0.5 Hz elektrisch stimuliert. Die Analyse der Kinetik der einzelnen Transienten ergab eine deutliche Verbreiterung der Calciumtransienten in Kardiomyozyten von  $\beta_1$ -transgenen Tieren (Abb.30).

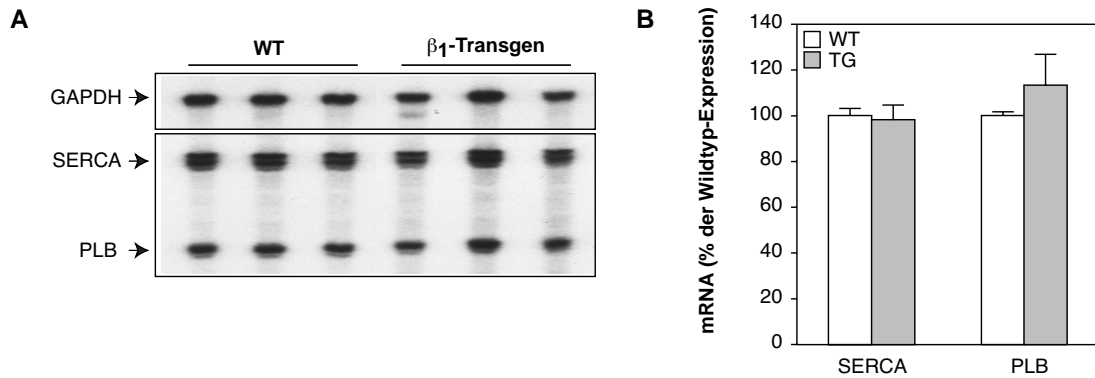


**Abb. 30. Gestörte Kinetik des intrazellulären Calciumtransienten in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.** (A) Vergleich zweier repräsentativer Calciumtransienten von Wildtyp- und  $\beta_1$ -transgenen Myozyten. (B) Durchschnittliche Halbwertszeit ( $T_{50}$ ) der Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration in Kardiomyozyten von Wildtyp und  $\beta_1$ -transgenen Tieren. Nach der Registrierung unstimulierter Calciumtransienten wurde Isoproterenol ( $1\mu\text{M}$ ) zugegeben. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 19-23 Zellen pro Gruppe aus 4 individuellen Kardiomyozytenpräparationen.  $p < 0.001$  TG vs. WT unstimuliert und nach Stimulation mit Isoprenalin.  $p < 0.01$  TG nach Stimulation mit Isoprenalin vs. WT unstimuliert.

### Expression von Calcium-regulierenden Proteinen in $\beta_1$ -transgenen Mäusen

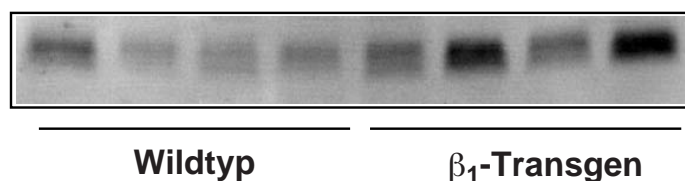
Die starke Beeinträchtigung der Calciumtransienten der einzelnen Kardiomyozyten weist auf eine gestörte Funktion oder Expression der Calcium-regulierenden Proteine des sarcoplasmatischen Retikulums hin. Es wurden deshalb die Expression der Sarcoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA), Phospholamban, Calsequestrin, Triadin-1 und Junctin auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

Die Bestimmung der mRNA-Konzentration der beiden zentralen Calcium-regulierenden Proteine SERCA und Phospholamban wurde mit Hilfe von RNase Protection Assays durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression (Abb. 31).



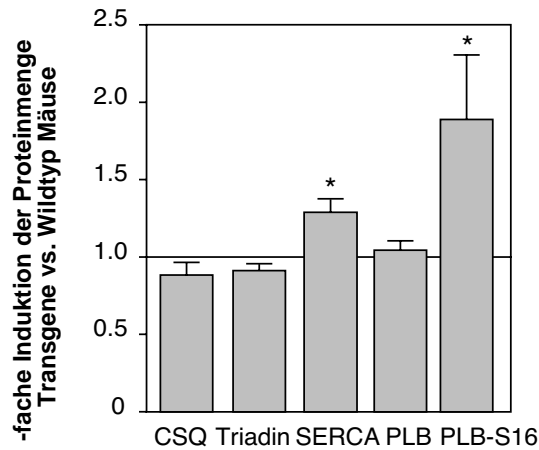
**Abb. 31. Unveränderte mRNA-Expression der SR-Proteine SERCA und Phospholamban.** (A) RNase Protection Assay der mRNA-Konzentration von SERCA, Phospholamban und GAPDH in Herzen von Wildtypen und  $\beta_1$ -transgenen Mäusen. Die Größe des geschützten Fragments beträgt 362bp für GAPDH, 247 bp für die SERCA und 201 bp für Phospholamban. (B) Quantifizierung der SERCA und Phospholamban-Expression im Alter von 2 Monaten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3-4 Tieren pro Gruppe mit 2 unabhängigen Messungen pro Tier.

Die Proteinexpression der Calcium-regulierenden Proteine Calsequestrin, Triadin, SERCA und Phospholamban wurde mit quantitativem Western Blotting in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Joachim Neumann (Universität Münster) durchgeführt. Zudem wurde mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern die Phosphorylierung des Phospholamban an Position 16 bestimmt. Dabei zeigte sich bei unveränderter Proteinexpression eine verstärkte Phosphorylierung des Phospholambans am Ser16 als Ausdruck einer verstärkten  $\beta_1$ -Rezeptor- und PKA-vermittelten Phosphorylierung (Abb. 32 und 33).



**Abb. 32. Verstärkte Phosphorylierung von Phospholamban in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.** Bestimmung durch quantitatives Western-Blotting mit Hilfe von Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern.

Die Proteinexpression von Calsequestrin und Triadin war unverändert, bei der SERCA zeigte sich eine leichte Expressionszunahme (Abb. 33).

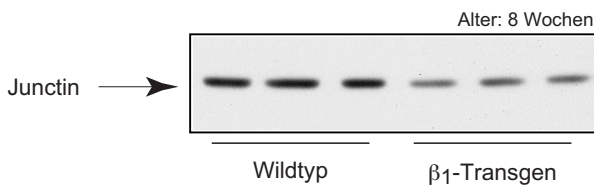


**Abb. 33. Expression Calcium-regulierender Proteine.** Proteinexpression von Calsequestrin, Triadin, SERCA, Phospholamban und der an Serin16 phosphorylierten Form von Phospholamban. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 6 Tieren pro Gruppe im Alter von 2 Monaten.  $p < 0.01$  TG vs. WT.

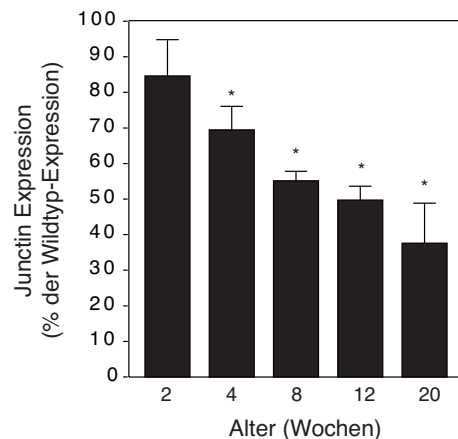
Diese Veränderungen können eine Verbreiterung des intrazellulären Calciumtransienten nicht erklären. Sie sind allenfalls als potentielle Kompensationsmechanismen zu verstehen, die dazu dienen die Calciumhomöostase der Zelle zu normalisieren.

Eine interessante Veränderung zeigte sich jedoch bei der Bestimmung der Junctin-Expression. Junctin als Interaktionspartner des Calcium-freisetzenden Ryanodinrezeptors zeigte eine deutlich verminderte Expression bereits in 2 Monate alten Tieren und in älteren Tieren (Abb. 34).

A



B



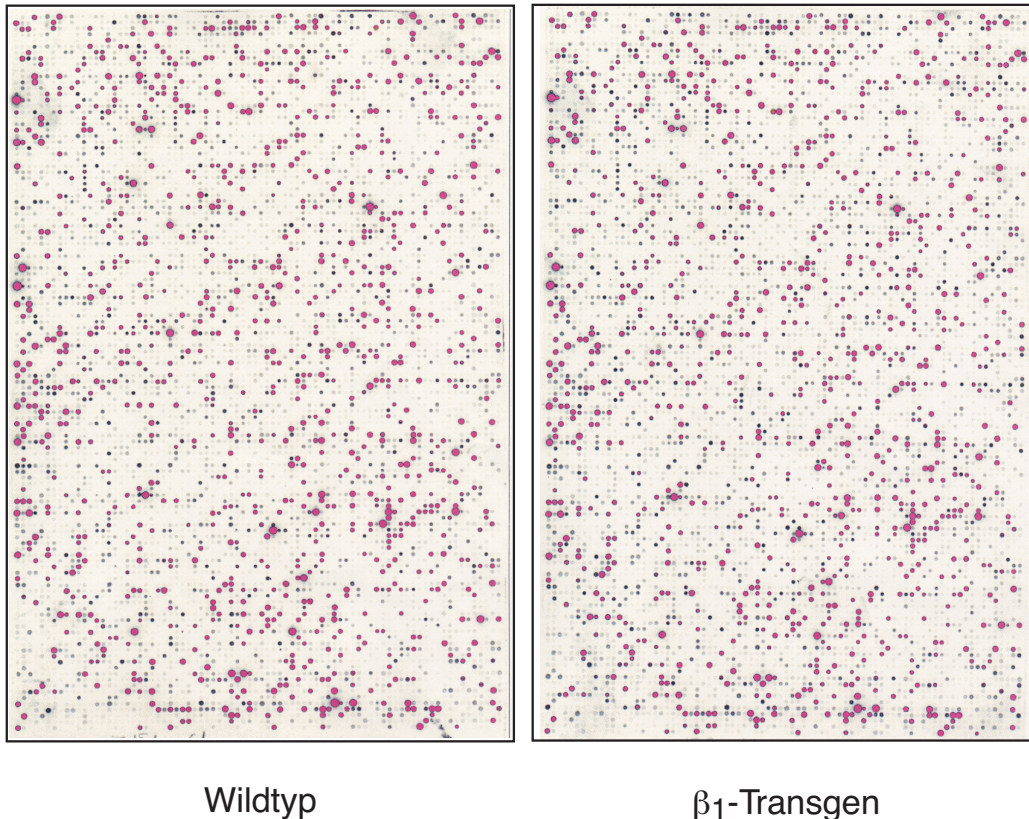
**Abb. 34. Progressive Verminderung der Expression von Junctin.** (A) Repräsentativer Western Blot aus linksventrikulärem Myokard von 2 Monate alten Wildtypen und  $\beta_1$ -transgenen Tieren. (B) Progressive Verminderung der Expression von Junctin in 2-20 Wochen alten  $\beta_1$ -transgenen Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM;  $n=3-11$ ;  $p < 0.001$  WT vs. TG.





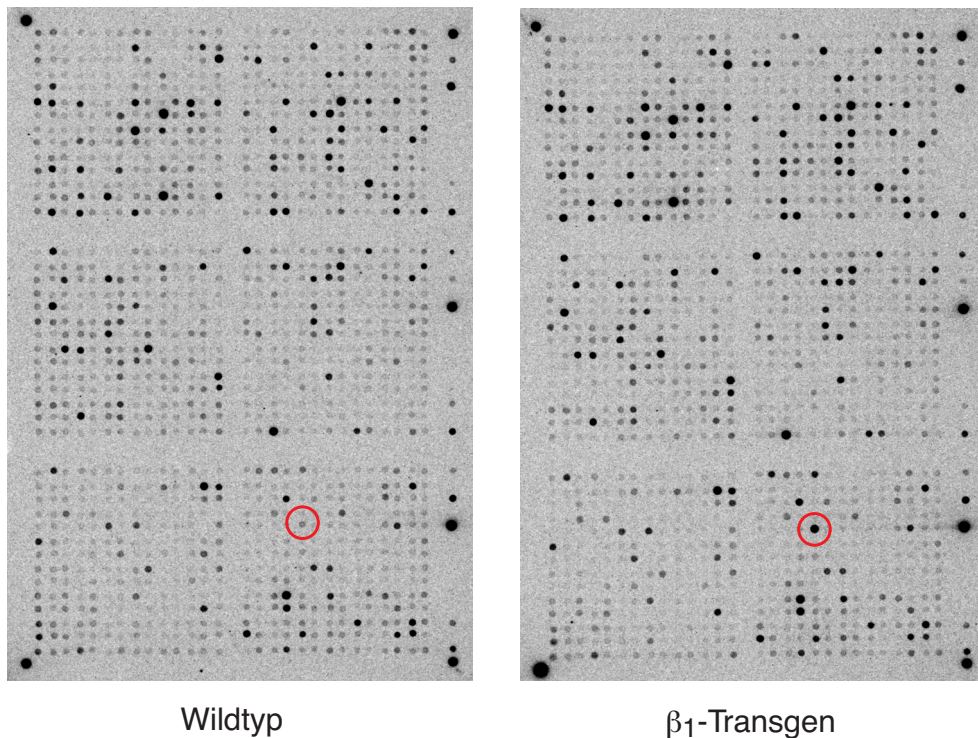
morphologischen und funktionellen Veränderungen ist sehr typisch für die Veränderungen, die man bei der menschlichen Herzinsuffizienz beobachtet. Während Herzinsuffizienzpatienten keine erhöhte Expression von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren zeigen (das Gegenteil ist der Fall), so kommt es bei einem Großteil der Herzinsuffizienzpatienten zu einer verstärkten Ausschüttung von Katecholaminen, deren Ausmaß mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Swedberg et al., 1990). Die Blockade dieser chronischen  $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung mit  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten führt dagegen zu einer Senkung der Herzinsuffizienz mortalität und belegt damit die wichtige Rolle, die die Überstimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in der Progression einer Herzinsuffizienz spielt.

Zur Identifikation neuer Kandidatengene für Herzhypertrophie und -insuffizienz wurde zunächst RNA von jungen Tieren isoliert, die erst milde morphologische Veränderungen zeigten. Die RNA von jeweils vier Geschwistertieren wurde gepoolt und dann daraus PolyA-RNA aufgereinigt. Diese wurde nun in Gegenwart radioaktiv markierter Nukleotide in cDNA revers transkribiert. Die so erhaltenen Sonden wurden nun an Nylonmembranen hybridisiert, auf die die Sequenzen von 23.000 Expressed Sequence Tags (ESTs, High-density Membranen des Max-Planck Instituts für Molekulare Genetik in Berlin) bzw. 1.200 verschiedenen Genen (Membranen der Firma Clontech) aufgebracht waren. Die folgende Abbildung zeigt das Hybridisierungsmuster zweier sog. High-density-Membranen:



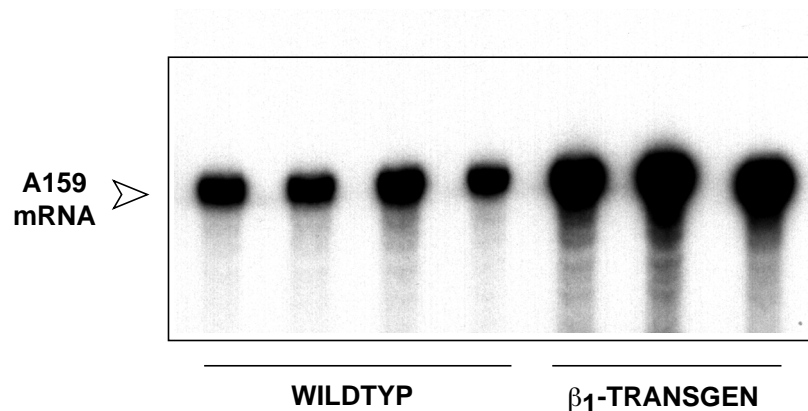
**Abb.36. Vergleich der Hybridisierungsmuster radioaktiv markierter cDNA-Sonden an High-Density-Membranen.** Messenger RNA wurde aus den Herzen von je 4 Tieren im Alter von 12 Wochen isoliert. Die mRNAs wurden nun gepoolt, unter Verwendung von radioaktiv markierten Nukleotiden in cDNA transkribiert und an GeneArray-Membranen hybridisiert. Die Signale wurden mit einem Phosphorimager detektiert.

Parallel zu diesen High-Density-Membranen wurden auch kommerzielle Membranen der Firma Clontech verwendet. Diese haben den Vorteil einer wesentlich einfacheren Handhabung und höheren Spezifität, die aber mit dem Nachteil einhergeht, dass nur vergleichsweise wenige Gene untersucht werden können. Die verwendeten Membranen enthalten die Sequenz für den murinen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor, an den die Sequenz des überexprimierten humanen  $\beta$ -adrenergen Rezeptors gut hybridisiert:



**Abb.37. Vergleich der Hybridisierungsmuster radioaktiv markierter cDNA-Sonden an kommerziell verfügbare Membranen der Firma Clontech.** Rot markiert ist das Hybridisierungssignal des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.

In einem zweiten Schritt wurden die als differentiell exprimiert erkannten mRNAs mit Hilfe quantitativer Methoden in unabhängigen Herzproben untersucht. Dazu wurden RNase Protection Assays und quantitative PCR-Reaktionen eingesetzt. Dadurch wurden die differentielle Expression von 11 mRNAs verifiziert. Abb. 36 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines RNase Protection Assays:

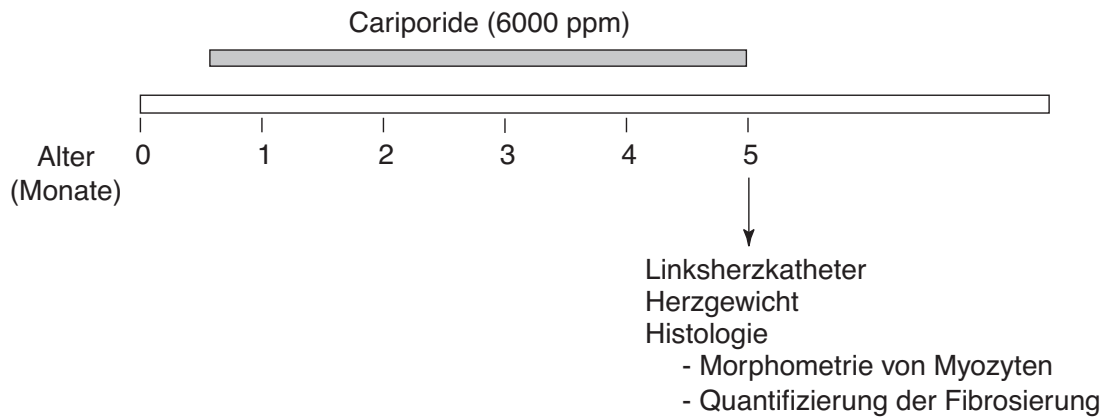


**Abb. 38. RNAs Protection Assay einer differentiell exprimierten kardialen mRNA.** Jeweils 5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit einer radioaktiv markierten Antisense RNA-Sonde versetzt und nach dem Verdau nicht-hybridisierter Einzelstrang-RNA auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Mit drei besonders interessanten neuen Kandidatengenen, die jeweils in der Erkrankung verstärkt exprimiert sind, wird gegenwärtig weitergearbeitet. Dabei werden unter anderem Antikörper erzeugt, die Expression bei humaner Herzinsuffizienz untersucht und es werden transgene Mäuse mit herz-spezifischer Überexpression dieser Kandidatengene generiert. Eine alternative Strategie zur Validierung der Bedeutung eines differentiell exprimierten Kandidatengens besteht darin seine Bedeutung für die Entstehung der Erkrankung durch Therapieversuche mit einem Inhibitor des entsprechenden Proteins zu unternehmen. Dies soll im folgenden Kapitel anhand des Natrium-Protonen-Austauschers (Isoform1, NHE1) veranschaulicht werden.

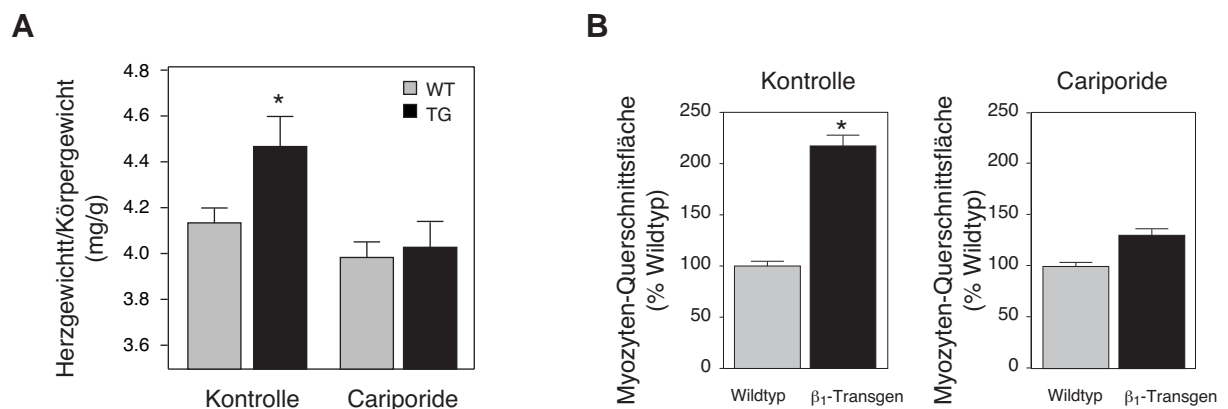
### **Validierung der Bedeutung eines neuen Kandidatengens für Herzhypertrophie und –insuffizienz**

Um die Bedeutung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers für die Entstehung von Herzhypertrophie und –insuffizienz zu bestimmen stehen hochselektive Inhibitoren zur Verfügung. Diese wurden ursprünglich für die Anwendung in der myokardialen Ischämie entwickelt, da es dort zu einer Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers mit nachfolgendem Austausch des Natriums gegen Calcium kommt. Es konnte gezeigt werden, daß sich durch Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers mit Cariporide die post-ischämisch auftretende Calciumüberladung vermindern lässt (Stromer et al., 2000) und sich auch verschiedene funktionelle Parameter bei Patienten nach ischämischen Ereignissen verbessern (Rupprecht et al., 2000). Wir haben nun postuliert, daß dieses pathophysiologische Prinzip auch bei den schädlichen Auswirkungen einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden  $\beta_1$ -transgene Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere mit dem NHE1-Inhibitor Cariporide behandelt und der Einfluß dieser Therapie auf die Entwicklung des Phänotyps untersucht. Die Tiere wurden dazu bis zu einem Alter von 5 Monaten therapiert.



**Abb.39. Therapieschema des Behandlungsversuches mit Cariporide.**  $\beta_1$ -transgene Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere wurden bis zum Alter von 5 Monaten mit dem NHE1-Inhibitor Cariporide behandelt.

Bei der morphologischen Untersuchung der Herzen zeigte sich zunächst, daß die Therapie mit Cariporide in der Lage ist die  $\beta$ -adrenerg induzierte Herzhypertrophie nahezu vollständig zu inhibieren (Abb.40).

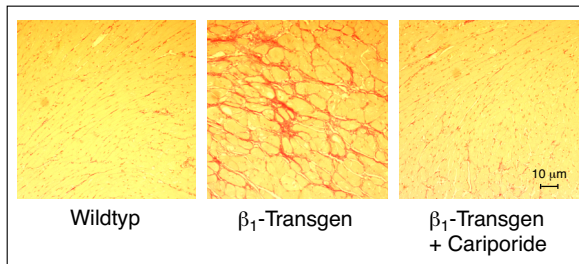


**Abb. 41. Die Inhibition des kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers mit Cariporide verhindert die Entwicklung von Herzhypertrophie.** (A) Herz- zu Körpergewichtverhältnis in  $\beta_1$ -transgenen und Wildtyp-Mäusen unter Therapie mit Cariporide. (B) Myozytenquerschnittsfläche von linksventrikulären Kardiomyozyten.

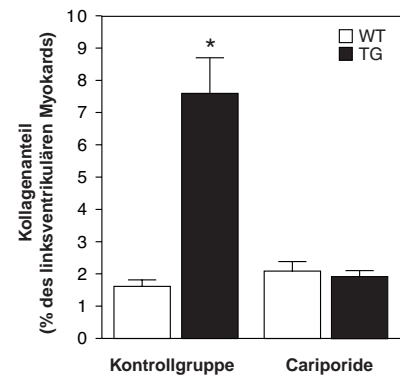
Während sich in den unbehandelten  $\beta_1$ -transgenen Tieren eine signifikante Zunahme des Herzgewichts beobachten läßt, wird diese Hypertrophie unter Therapie mit Cariporide vollständig unterdrückt. Dies bestätigt auch die morphometrische Analyse der Myozytenquerschnittsflächen von links-ventrikulären Kardiomyozyten. Cariporide führte zu einer Abnahme der Kardiomyozytenhypertrophie um 80%.

Ein weiteres morphologisches Zeichen der myokardialen Schädigung durch chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation stellt die interstitielle Fibrosierung des Myokards dar. Die Therapie mit Cariporide konnte die  $\beta$ -adrenerg induzierte Fibrosierung vollständig unterdrücken.

A

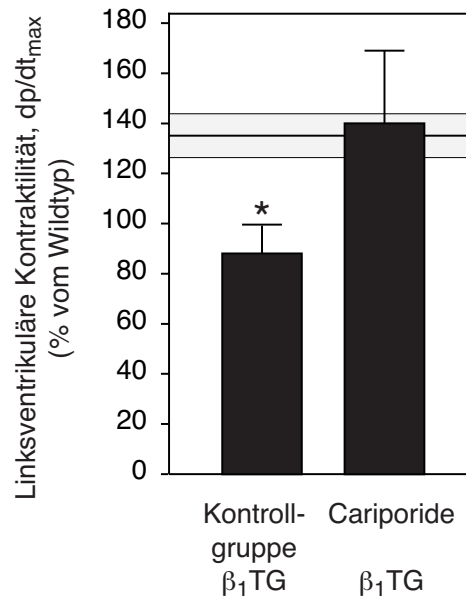


B



**Abb. 42. Unterdrückung der durch  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation induzierten linksventrikulären Fibrosierung durch Cariporide.** (A) Zur Bestimmung des linksventrikulären Kollagengehalts wurden Paraffinschnitte von Mäuseherzen mit Pikrinsäure/Sirius Rot gefärbt. (B) Der prozentuale Flächenanteil des Kollagens wurde mit Hilfe einer digitalen Bildanalyse-Software bestimmt (LuciaG Software, Nikon).

Vermag die Therapie mit Cariporide auch die funktionelle Beeinträchtigung der Herzen von  $\beta_1$ -transgenen Tieren aufzuhalten? Um diese Frage zu beantworten wurden behandelte und unbehandelte Tiere linksventrikulär katheterisiert und es wurde die linksventrikuläre Kontraktilität bestimmt. Die pharmakologische Inhibition des kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers konnte auch die funktionelle Beeinträchtigung des Herzens verhindern (Abb. 43).



**Abb. 43. Cariporide verhindert den Verlust der linksventrikulären Kontraktilität durch chronische  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation.**  $\beta_1$ -transgene Mäuse zeigen eine eingeschränkte linksventrikuläre Kontraktilität verglichen mit jungen  $\beta_1$ -transgenen Mäusen (schraffierte Fläche zeigt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler im Alter von 12 Wochen). Die Therapie mit Cariporide verhinderte diese Abnahme der linksventrikulären Kontraktilität.

Die Therapie mit Cariporide konnte also die normalerweise zu beobachtende progressive Einschränkung der linksventrikulären Funktion aufhalten.



## DISKUSSION

### Die Bedeutung der $\beta_1$ -Rezeptorabnahme für die Pathogenese der Herzinsuffizienz.

Die Stimulation kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren stellt den quantitativ bedeutendsten Mechanismus dar, um Schlagkraft und Frequenz des Herzens zu steigern (Brodde, 1993). Während der Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz kommt es beim Menschen zu einer progressiven Verminderung der Dichte myokardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren. Die beobachtete Expressionsverminderung ist sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene in der Mehrzahl der Untersuchungen auf den  $\beta_1$ -Subtyp beschränkt, während aus nach wie vor ungeklärten Gründen die Expression des  $\beta_2$ -Subtyps kaum verändert ist. Dabei korreliert die verminderte Expression der  $\beta_1$ -AR mRNA eng mit dem klinischen Schweregrad der Herzinsuffizienz (Engelhardt et al., 1996). Der ursächliche Mechanismus dieser Rezeptorabnahme scheint in der bei Herzinsuffizienz beobachteten sympathischen Aktivierung zu liegen, die mit einem Anstieg der Katecholaminkonzentrationen im Plasma und an sympathischen Nervenendigungen einhergeht (Swedberg et al., 1990).

Unklar war bei diesen Veränderungen jedoch, ob es sich um einen Schutzmechanismus vor potentiell toxischen Wirkungen einer chronischen  $\beta$ -Rezeptorstimulation oder einen pathologischen Prozess handelt, der die hämodynamische Situation noch weiter verschlechtert. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde dieses Phänomen überwiegend als schädlich und als für die Progression einer Herzinsuffizienz mitverantwortlich angesehen (Brodde und Michel, 1999). Konsequenterweise wurden therapeutische Strategien entwickelt, die auf die Aufhebung dieser Desensibilisierung zielten oder diese durch Überexpression von Rezeptoren zu kompensieren versuchten. Diese Strategien beinhalteten den Gentransfer von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren (Akhter et al., 1997) und eines C-terminalen Fragmentes der GRK2 ( $\beta$ ARKct) (White et al., 2000). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß die Ansprechbarkeit der kardialen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in Herzinsuffizienzmodellen nach dem Gentransfer erhöht war. Zudem konnte für den  $\beta$ ARKct gezeigt werden, daß durch Einkreuzung einer  $\beta$ ARKct-transgenen Linie eine ganze Reihe von Herzinsuffizienzmodellen erfolgreich therapiert werden konnte (Harding et al., 2001; Rockman et al., 1998; White et al.,

2000). Dies wurde als Indiz für eine generell günstige Wirkung einer Inhibition der  $\beta$ -Rezeptor-Desensibilisierung gewertet.

Diese Befunde stehen klinischen Studien an Herzinsuffizienzpatienten gegenüber, die das Gegenteil zu belegen scheinen: Eine positiv inotrope Therapie mit  $\beta$ -Rezeptoragonisten und Phosphodiesterasehemmstoffen führt kurzfristig zu einer raschen Besserung des klinischen Bildes, langfristig aber in allen größeren klinischen Studien zu einer Erhöhung der Mortalität (Lowe et al., 2000). Klinische Studien mit  $\beta$ -Rezeptorantagonisten zeigten kurzfristig eine Verschlechterung der hämodynamischen Situation, bei chronischer Therapie jedoch eine Verminderung der Mortalität von Herzinsuffizienzpatienten. Angesichts der Tatsache, daß dieser Mortalitätsvorteil zusätzlich zu einer Standardtherapie mit Diuretika und ACE-Hemmstoffen erzielt wurde, ist davon auszugehen, daß es sich bei den  $\beta$ -Blockern um die wirksamste Einzelmedikation zur Behandlung der Herzinsuffizienz handelt (Bristow, 2000). Dies ist inzwischen in mehreren großen klinischen Studien wiederholt gezeigt worden und hat in den letzten Jahren Eingang in die Therapie der Herzinsuffizienz gefunden. Dabei hat sich gezeigt, dass selbst  $\beta$ -adrenerge Rezeptorantagonisten mit partialagonistischer Wirkung sich bei chronischer Applikation ungünstig auswirken und die Sterblichkeit erhöhen (Xameterol in Severe Heart Failure Study Group, 1990). Diese Befunde bestätigen also eher die Hypothese, daß die chronische Aktivierung kardialer  $\beta_1$ -Rezeptoren zur Progression einer Herzinsuffizienz beiträgt.

Wie lassen sich diese konträren Ergebnisse in Einklang bringen? Um die Rolle der chronischen Aktivierung  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren in der Herzinsuffizienz zu untersuchen haben wir den humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor im Herzen transgener Mäuse überexprimiert. Die 15-fache Überexpression (gemessen im Alter von 4 Wochen) des  $\beta_1$ -Rezeptors führte dabei nur zu einer kurzfristigen Erhöhung der kardialen Kontraktilität *in vivo*. Es kam daraufhin in diesen Tieren zu einer ausgeprägten Kardiomyozytenhypertrophie und zur Entstehung einer interstitiellen Fibrose. Ab dem 4. Lebensmonat zeigte sich eine progressive Verminderung der linksventrikulären Funktion dieser Tiere, die in das klinische Bild einer Herzinsuffizienz mündete. Ab einem Alter von 10 Monaten werden die Tiere tachypnoeisch, es treten Pleuraergüsse auf und die Tiere versterben etwa im Alter von 12 Monaten. Dieser Phänotyp ist inzwischen durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt worden, die ebenfalls den humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor kardial

überexprimiert hat (Bisognano et al., 2000). Diese Befunde belegen, daß eine chronische Stimulation kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren eine Herzinsuffizienz per se auslöst bzw. deren Progression fördert.

Für die Interpretation der Versuchsansätze, die den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor oder den  $\beta$ ARKct überexprimiert haben, bieten sich neue Erklärungsmöglichkeiten an: Nicht die Inhibition der  $\beta$ -Rezeptor-Desensibilisierung war hier ausschlaggebend für den Erfolg, sondern 2 alternative Wirkmechanismen. Im Falle der  $\beta_2$ -Rezeptor-überexpression wurde eben nicht die ursprüngliche vom  $\beta_1$ -Subtyp dominierte Signaltransduktion wiederhergestellt, sondern ein  $\beta_2$ -dominiertes System generiert, das bei chronischer Aktivierung weniger toxisch auf das Myokard wirkt (vgl. die Diskussion der Subtyp-spezifischen Signaltransduktion). Neuere Befunde deuten zudem darauf hin, daß bei der Überexpression des  $\beta$ ARKct ein anderes Wirkprinzip als das bislang postulierte ausschlaggebend sein könnte. So stellt der  $\beta$ ARKct einen wirksamen Fänger von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-proteinen dar (Kim et al., 1993; Koch et al., 1994). Dieser Effekt könnte bewirken, daß eine Vielzahl von  $\beta\gamma$ -vermittelten und an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligten Signalwegen gehemmt werden. Dies könnte insbesondere für die Aktivierung kardialer MAP-Kinasen zutreffen (Sugden und Clerk, 1998b).

Aufgrund des Phänotyps des von uns generierten Tiermodells und aufgrund der in den letzten Jahren durchgeführten klinischen Studien kann nun davon ausgegangen werden, daß die in der Herzinsuffizienz beobachtete Desensibilisierung  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren einen protektiven Mechanismus darstellt. Durch die zahlenmäßige und funktionelle Abnahme werden die deletären Effekte chronischer  $\beta_1$ -vermittelter Stimulation vermindert. Eine Therapie mit  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten benutzt dieses protektive Prinzip, indem es das System noch über die endogene Desensibilisierung hinaus abschaltet.

## Warum zwei verschiedene $\beta$ -Rezeptorsubtypen im Myokard?

Entgegen der traditionellen Vorstellung, daß die Existenz der beiden im adulten Organismus funktionell dominierenden  $\beta$ -Rezeptor-Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sich vor allem durch ihre unterschiedliche Verteilung auf verschiedene Organe oder Zelltypen erklärt (Buxton und Brunton, 1985), ist inzwischen klar, daß Herzmuskelzellen sowohl  $\beta_1$ - als auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren (Altschuld et al., 1995; Xiao und Lakatta, 1993). Gibt es funktionelle Unterschiede der beiden auf Kardiomyozyten dominierenden Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ? Eine Reihe von in vitro an isolierten Kardiomyozyten durchgeführten Experimenten weisen darauf hin, daß dies der Fall ist. So konnte die Arbeitsgruppe von Edward Lakatta zeigen, daß kardiale  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, nicht jedoch  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren an inhibitorische G-proteine koppeln (Xiao et al., 1999). Inwieweit dies auch für das humane Myokard zutrifft, ist derzeit strittig (Kilts et al., 2000; Molenaar et al., 2000). Durch diese unterschiedliche G-protein-Kopplung ließ sich ein weiterer kürzlich entdeckter Befund erklären: Die Stimulation  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren hat einen gegensätzlichen Effekt auf die Apoptose von Kardiomyozyten (Communal et al., 1999; Zaugg et al., 2000). Dabei konnte eine subtyp-spezifische Stimulation von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren eine  $\beta_1$ -induzierte Apoptose inhibieren. Dieser Effekt war durch eine Kopplung an inhibitorische G-proteine vermittelt, da er sich durch Pertussistoxin hemmen ließ (Communal et al., 1999). Über die weitere Signaltransduktion liegen allerdings widersprüchliche Daten vor: So publizierten Communal et al. Daten, die eine Gi-vermittelte Aktivierung der p38 MAP-Kinase als protektives Prinzip beschreiben (Communal et al., 2000), während die Gruppe von RuiPing Xiao eine Gi-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase/PKB als alleinigen verantwortlichen Signalweg beschreibt (Chesley et al., 2000)

Für den  $\beta_2$ -Subtyp sind noch weitere Signalwege beschrieben worden. Diese umfassen die Aktivierung der ERK (van Biesen et al., 1996) und die Interaktion mit einem Faktor, der den Natrium-Protonen-Austauscher reguliert (NHERF) (Hall et al., 1998) Für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor ist dagegen bisher nur die Kopplung an stimulatorische G-proteine bekannt. Dies ist wahrscheinlich auch Ausdruck der Tatsache, daß die Signaltransduktion des  $\beta_1$ -Subtyps im Gegensatz zum  $\beta_2$ -Subtyp

nur wenig intensiv erforscht wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun der Versuch gemacht werden, diese Befunde auf die *in vivo* Situation zu übertragen. Während die Kopplung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren an inhibitorische G-proteine auch in dem von uns untersuchten Mausmodell gut belegt ist, existieren für die differentielle Aktivierung der p38 MAP-Kinase und des PI3-Kinase-Weges bislang ausschließlich Daten, die an isolierten Zellen erhoben wurden. Überraschenderweise ergab sich bei der Untersuchung der kardialen MAP-Kinase-Aktivierung *in vivo* ein gänzlich verschiedenes Bild. In den  $\beta_2$ -transgenen Tieren ließ sich keine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren oder  $\beta_1$ -transgenen Tieren erhöhte p38 MAP-Kinase-Aktivität feststellen. Auch die Phosphorylierung der Proteinkinase B als Ausdruck ihrer Aktivierung war unverändert. Dagegen wiesen  $\beta_1$ -transgene Mäuse eine deutliche Aktivierung der ERK-Kinase auf. Diese Aktivierung war besonders ausgeprägt in 4 Monate alten Tieren, ein Alter, in dem die transgenen Tiere eine besonders hohe Rezeptordichte aufweisen.

Weshalb unterscheiden sich diese Befunde so grundlegend von den *in vitro* erhobenen Ergebnissen? Die unterschiedliche Aktivierung könnte insbesondere durch den unterschiedlichen Zeitrahmen der Rezeptoraktivierung bedingt sein. Die in isolierten Zellen gefundene MAP-Kinase Aktivierung wurde dabei 30-60 min nach Rezeptorstimulation gemessen (Chesley et al., 2000; Communal et al., 2000). Das Ergebnis einer Stimulation in einem physiologischen Zeitrahmen, d.h. über Tage oder Wochen, könnte jedoch ein ganz anderes sein, da hier zahlreiche Regulationsmechanismen wirksam werden. So ist die Aktivität der Proteinkinase Akt, die in der Arbeit von Zhu et al. für den Apoptose-protectiven Effekt einer  $\beta_2$ -Stimulation verantwortlich gemacht wird, bereits nach 60 min Stimulation mit Isoproterenol *unter* den Ausgangswert abgesunken (Zhu et al. 2001). Von den Autoren wird jedoch lediglich ein kurzer Stimulationsgipfel nach 30 min Stimulation betrachtet. Es ist wahrscheinlich, daß in einem Krankheitsgeschehen wie der Herzinsuffizienz, das sich über Monate unter dem Einfluß chronisch erhöhter Katecholamine verschlechtert, ein solcher Kurzzeiteffekt kaum zum tragen kommen kann.

Was ist der Mechanismus der den beiden Subtypen eine unterschiedliche Stimulation der ERK-Kinase erlaubt? Diese Frage läßt sich nur sehr schwierig beantworten, da diese Subtypspezifität nach Kurzzeitstimulation in Zellkultursystemen fehlt. So können in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach

Kurzzeitstimulation sowohl  $\beta_1$ - als auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in etwa gleichem Ausmaß die Aktivität der ERK stimulieren (unveröffentlichte Versuchsergebnisse). Länger dauernde Stimulationsversuche in diesem System sind schwierig durchzuführen, da ein großer Teil der Zellen dann apoptotisch zugrunde geht. So ist man weiterhin auf das Modell der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -transgenen Tiere angewiesen, in dem jedoch das Problem besteht, daß es in den beiden Modellen zu einer unterschiedlich starken Hypertrophie- und Fibroseentwicklung kommt. Als ein möglicher durchzuführender Versuch erscheint die Applikation eines Rezeptorantagonisten für einige Tage in beiden Tiermodellen. Diese Abschaltung des Rezeptors sollte eine Rezeptorvermittelte, nicht jedoch eine unspezifische Hypertrophie-assoziierte oder durch Fibroblastenvermehrung hervorgerufene ERK-Aktivierung vermindern.

Die subtypspezifische Aktivierung der ERK könnte jedoch auch mit der unterschiedlichen spontanen Aktivität der beiden Rezeptorsubtypen zu tun haben.  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren weisen eine deutlich höhere spontane Aktivität als  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren (siehe bei (Zhou et al., 2000b) und diese Arbeit). In den  $\beta_1$ -transgenen Mäusen ist eine Stimulation der Rezeptoren also überwiegend von einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems abhängig und damit vor dem Auftreten einer Herzinsuffizienz wahrscheinlich pulsatil. Im Gegensatz dazu liegt in den  $\beta_2$ -transgenen Tieren eine chronische Daueraktivität der Rezeptoren vor. Dies könnte aus 2 Gründen für die beobachteten Unterschiede in den Phänotypen verantwortlich sein. Erstens könnte dies dazu führen, daß in den  $\beta_2$ -transgenen Mäusen eine Desensibilisierung der ERK-Aktivierung auftritt, die sich in den  $\beta_1$ -transgenen Tieren aufgrund der zeitlich gestaffelten Aktivierung nicht ausbilden kann. Allerdings ist das Phänomen der ERK-Aktivierung in nahezu allen  $\beta_1$ -transgenen Tieren zu beobachten. Käme es allerdings erst kurzfristig im Rahmen der Gewebentnahme der Herzen zu dieser MAP-Kinase-aktivierung, wäre dies ein denkbarer Mechanismus. Zweitens ist aus anderen Systemen (PC12 Zellen) bekannt, daß eine unterschiedliche Aktivierungsdauer einer MAP-Kinase ganz unterschiedliche Effekte bedingen kann (Marshall, 1995).

## Konstitutive Aktivität des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der humane  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor spontan aktiv ist und daß klinisch verwendete  $\beta$ -Blocker als inverse Agonisten diese Aktivität unterdrücken können. Während viele G-proteingekoppelte Rezeptoren hinsichtlich ihrer spontanen Aktivität untersucht wurden, existieren nur wenige Studien zum  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. In isolierten Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, daß  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren sarcolemmale Calciumkanäle aktivieren (Mewes et al., 1993). Kürzlich wurde auch anhand von Herzgewebe von Menschen und Ratten gezeigt, daß  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren konstitutiv aktiv sind (Maack et al., 2000; Varma et al., 1999). Es ist hier jedoch sehr schwierig die beobachteten Effekte auf den  $\beta_1$ -Subtyp zurückzuführen, da 30% der  $\beta$ -Rezeptoren auf Kardiomyozyten von Ratten und Menschen dem  $\beta_2$ -Subtyp zugehören (Brodde und Michel, 1999). Da der  $\beta_2$ -Subtyp eine wesentlich höhere spontane Aktivität als der  $\beta_1$ -Subtyp aufweist (siehe unten), könnte es zu einer Überschätzung der spontanen Aktivität des  $\beta_1$ -Subtyps kommen, wenn ein kleiner Teil der  $\beta_2$ -Rezeptoren in Experimenten mit  $\beta_1$ -Antagonisten blockiert wird. Ob dies der Fall ist, ist in den genannten Studien an humanem Gewebe oder Zellen nicht geprüft worden (z.B. durch Zugabe des  $\beta_2$ -selektiven Antagonisten ICI118551). Im Vergleich dazu kann Vorhofgewebe von  $\beta_1$ -Rezeptor überexprimierenden Mäusen als weitgehend frei von funktionell aktiven  $\beta_2$ -Rezeptoren gelten, da  $\beta_1$ -Rezeptor Knockout Mäuse keine kontraktile Antwort auf Isoprenalin zeigen (Rohrer et al., 1996) und der  $\beta_1$ -Anteil verstärkt ist.

Kürzlich berichteten Zhou et al. von einer nur marginalen Zunahme der Kontraktionsamplitude nach Transfektion von isolierten Kardiomyozyten mit dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor (Zhou et al., 2000b). Nach Zugabe von CGP20712A kam es nur zu einer kleinen, nicht signifikanten Abnahme der Kontraktionsamplitude. Für diese Unterschiede zu den hier dargestellten Ergebnissen kommen verschiedene Ursachen in Betracht: 1) Die von Zhou et al. untersuchten transfizierten Kardiomyozyten wiesen deutlich geringere Rezeptordichten auf als das von uns untersuchte Mausmodell (0,6 pmol/mg Membranprotein vs.  $2,7 \pm 0,3$  pmol/mg Membranprotein). 2) Zhou et al. untersuchten die Kontraktionskraft, während in der vorliegenden Arbeit die Schlagfrequenz isolierter Vorhöfe untersucht wurde. 3) Die

eingesetzten experimentellen Systeme unterscheiden sich deutlich: Während in der vorliegenden Arbeit Organphysiologie an einem transgenen Tiermodell betrieben wurde, untersuchten Zhou et al. die Auswirkungen von kurzzeitiger (d.h. innerhalb von Tagen) Überexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in Zellen. Die erhöhte Schlagfrequenz isolierter rechter Vorhöfe von  $\beta_1$ -transgenen Mäusen erscheint als besonders sensitive Methode um die Spontanaktivität dieser Rezeptoren zu bestimmen. Insbesondere weist der Meßparameter eine sehr geringe Streuung auf und kann mit hoher Genauigkeit gemessen werden.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den für  $\beta_2$ -transgene Tiere publizierten Daten (Bond et al., 1995; Milano et al., 1994) zeigt, daß  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren eine deutlich höhere konstitutive Aktivität als  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren aufweisen. Dies konnte in unserem Labor auch anhand von Versuchen mit COS7-Zellen verifiziert werden, die mit den cDNAs des  $\beta_1$ - und des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors transfiziert wurden. Bei gleicher Rezeptordichte waren die unstimulierten cAMP-Spiegel in den  $\beta_2$ -überexprimierenden Zellen etwa 5 mal so hoch wie in  $\beta_1$ -überexprimierenden Zellen (Versuche von G-H. Fang). Auch dies läßt den Schluß zu, daß  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren eine zwar meßbare, jedoch im Vergleich zu  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren deutlich geringere spontane Aktivität aufweisen.

Ist die konstitutive Aktivität  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren von klinischer Bedeutung? Wenn man bedenkt, daß in dem hier untersuchten Tiermodell der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor etwa 40fach überexprimiert war, wird deutlich daß die spontane Aktivität des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors nur einen vergleichsweise kleinen Anteil an der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion ausmachen kann. Klinische Relevanz könnte die spontane Aktivität  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren jedoch in Situationen erlangen, in denen beispielsweise bereits eine geringe chronische Stimulation ein vorgeschädigtes Organ weiter beeinträchtigt (z.B. in der Herzinsuffizienz, siehe unten) oder wenn das Signaltransduktionssystem besonders sensibilisiert ist. So wurde von Mason et al. eine Mutation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors (Arg 389) beschrieben, die eine hohe Allelfrequenz und eine verstärkte Kopplung an Gs aufweist (Mason et al., 1999).

Auf eine potentielle klinische Relevanz weisen auch die beobachteten Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener  $\beta$ -Blocker hin.

So zeigten Bisoprolol und Metoprolol deutliche invers agonistische Aktivität, im Gegensatz zu Xamoterol, das partialagonistisch wirksam war. Dieser Unterschied



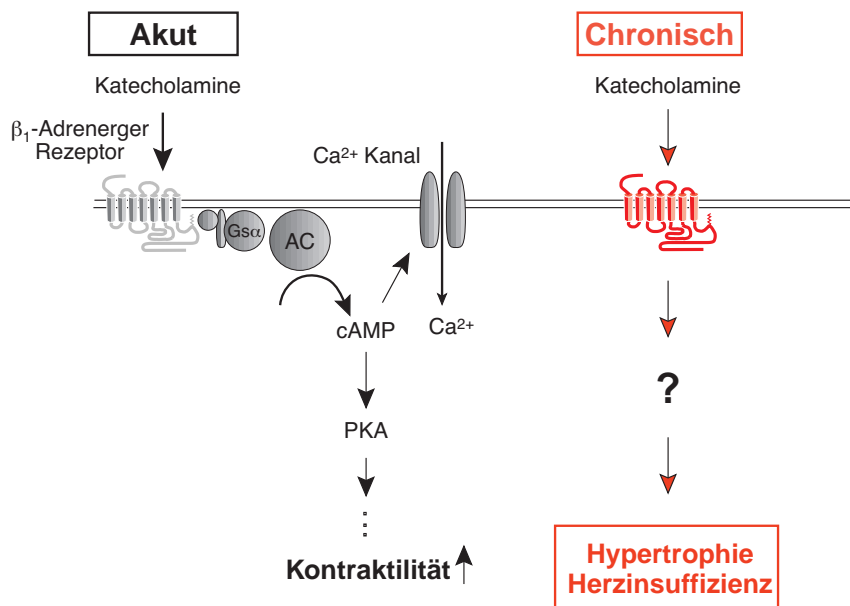
korreliert gut mit den Ergebnissen klinischer Studien an Herzinsuffizienzpatienten. Sowohl für Bisoprolol als auch für Metoprolol wurde inzwischen in großen klinischen Studien eine Senkung der Mortalität belegt (MERIT-HF Study group, 1999; CIBIS II Investigators and Committees, 1999). Im Gegensatz dazu führte die Therapie mit Xamoterol zu einer Erhöhung der Mortalität (Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group, 1990). Dies deutet darauf hin, daß eine chronische Stimulation  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren auch auf niedrigem Niveau schädlich für ein vorgeschädigtes Herz ist. Aufgrund der vorliegenden Befunde läßt sich annehmen, daß die meisten Substanzen mit partialagonistischer Wirkung schädliche Wirkungen in der Herzinsuffizienz haben. Auf eine schädliche Wirkung minimaler chronischer  $\beta_1$ -Stimulation weisen auch kürzlich veröffentlichte Arbeiten über  $\beta_1$ -Rezeptor Autoantikörper in der Herzinsuffizienz hin. Obwohl diese Antikörper nur eine sehr schwache intrinsische Aktivität an  $\beta_1$ -Rezeptoren aufweisen, sind sie mit einer verminderten kardialen Funktion assoziiert (Jahns et al., 1999; Wallukat et al., 1999) und ihre Entfernung führt zu einer klinischen Besserung (Muller et al., 2000).

Die klinisch wirksamen Substanzen Bisoprolol und Metoprolol unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer invers agonistischen Aktivität. Im Gegensatz dazu war Carvedilol kein inverser Agonist. Das in klinischen Studien sehr wirksame Carvedilol (Packer et al., 1996; Packer et al., 2001) läßt sich jedoch schlecht mit anderen  $\beta$ -Blockern vergleichen, da es zusätzlich zu seiner antagonistischen Wirkung an  $\beta_1$ -Rezeptoren ein Antagonist an  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren und starke antioxidative Eigenschaften hat (Dandona et al., 2000; Feuerstein et al., 1997). Beide Mechanismen könnten zu einer Mortalitätssenkung beitragen.

Inwieweit die invers agonistische Wirkung einzelner Substanzen mit dem Ergebnis klinischer Studien korreliert, wird sich endgültig erst anhand des Ergebnisses von aktuellen Studien beurteilen lassen, die direkt die Wirksamkeit verschiedener  $\beta$ -Rezeptorblocker in der Herzinsuffizienz vergleichen.

## Über welche Mechanismen führt $\beta$ -adrenerge Stimulation zu Herzhypertrophie?

Die Frage wie kardiale Hypertrophie entsteht, steht seit Jahren im Mittelpunkt des Interesses zahlreicher mit Signaltransduktion am Herzen befasster Gruppen. Der Phänotyp des von uns generierten Mausmodells belegt, daß die chronische Stimulation im Gegensatz zur akuten Stimulation  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren Hypertrophie von Kardiomyozyten induziert (Engelhardt et al., 1999). Diese Befunde sind kürzlich in transgenen Tieren (Bisognano et al., 2000) und in isolierten Zellen (Morisco et al., 2001) bestätigt worden (Abb. 37).



**Abb. 44. Die chronische Aktivierung kardialer  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren führt zu Herzhypertrophie und -insuffizienz.**

Es herrscht jedoch weitgehend Unklarheit darüber, wodurch diese hypertrophe Antwort der Kardiomyozyten bedingt ist. Als verantwortlich wurden eine Aktivierung von Calcineurin (De Windt et al., 2001), die Aktivierung der Ornithindecaboxylase (Schafer et al., 2000) und verschiedene Mitglieder der MAP-Kinase-Familie (Bueno et al., 2001) beschrieben. Zudem erscheint es plausibel, daß die mit chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation einhergehende Apoptose einzelner Kardiomyozyten (Anversa et al., 1996) zu reaktiver Hypertrophie der umliegenden Kardiomyozyten führt. Weiter muß in vielen untersuchten Systemen die durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation

induzierte mechanische Beanspruchung der Zelle bedacht werden. Da die Stimulation  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren den stärksten inotropen Stimulus am Herzen darstellt, werden beobachtete Rezeptor-vermittelte Veränderungen meist von mechanisch induzierten Veränderungen der Signaltransduktion überlagert (Ruwhof und van der Laarse, 2000).

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierte Mausmodell der  $\beta$ -adrenerg induzierten Herzhypertrophie ist aus mehreren Gründen besonders geeignet um diese Mechanismen näher zu untersuchen. So handelt es sich um eine ingezüchtete Linie, d.h. die genetische Heterogenität zwischen den einzelnen Tieren ist äußerst gering. Zudem entwickelt sich der Phänotyp der kardialen Hypertrophie sehr konstant und kontinuierlich. Es ist also möglich, in einem genau definierten Stadium der Hypertrophie- und Insuffizienzentwicklung Gewebe zu entnehmen und in diesem nach Veränderungen der Signaltransduktion zu suchen.

Es wurden nun 2 verschiedene Strategien verfolgt, um den Mechanismus  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie weiter aufzuklären. Zum einen wurden *gezielt* bekanntermaßen mit kardialer Hypertrophie in Verbindung stehende Mechanismen in dem vorliegenden Tiermodell untersucht. Zum anderen wurde *ungezielt*, unter anderem mit Gene Arrays nach neuen beteiligten Signalwegen gesucht.

Neben der im vorhergehenden Abschnitt erörterten Untersuchung der verschiedenen Signalwege der MAP-Kinasefamilie, war ein weiterer Schwerpunkt die Untersuchung des Calciumhaushalts in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen. In Studien an humanen Herzmuskelzellen zeigte sich, daß der intrazelluläre Calciumtransient in der Herzinsuffizienz gestört ist (Beuckelmann et al., 1992). Diese Störung, für die eine Verbreiterung des Calciumtransienten und ein Anstieg des diastolischen Calciums charakteristisch ist, wurde durch Versuche an verschiedenen Modellen als ein zentrales Ereignis in der Pathophysiologie der Hypertrophie- und Herzinsuffizienzentwicklung identifiziert. So konnte gezeigt werden, daß eine Normalisierung des Calciumtransienten durch Überexpression der sarco-plasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA) zu einer Verbesserung der Funktion von Einzelzellen (del Monte et al., 1999) und insuffizienten Herzen in Herzinsuffizienzmodellen (Miyamoto et al., 2000) führt. Die Arbeitsgruppe von Ken Chien zeigte kürzlich, daß eine Normalisierung des intrazellulären Calciumtransienten durch genetische Ablation des Gens für Phospholamban ein Herzinsuffizienzmodell heilen kann (Minamisawa et al., 1999). Für die zentrale Bedeutung der Calciumhomöostase spricht insbesondere die

Tatsache daß dem Herzinsuffizienzmodell ein Defekt im kontraktilem Apparat (MLP-knockout) zugrunde lag, also ein von der Calciumregulation des sarcoplasmatischen Retikulum weit entfernter Defekt.

Als Ursache der gestörten Calciumregulation wurde insbesondere eine verminderte Expression und Funktion der SERCA beschrieben (Mercadier et al., 1990).

Wir versuchten nun zunächst, die an insuffizienten menschlichen Kardiomyozyten erhobenen Befunde auf unser Tiermodell zu übertragen. Dazu wurden Kardiomyozyten von sehr jungen Tieren (8 Wochen) isoliert und dort die Kinetik des intrazellulären Calciumtransienten bestimmt. Dies ergab bereits in diesem frühen Stadium der Erkrankung eine deutliche Verbreiterung des Calciumtransienten, ähnlich wie dies für humane Zellen beschrieben ist. Um der Ursache dieser Veränderungen auf den Grund zu gehen, haben wir die Expression verschiedener Calcium-regulierender Proteine untersucht. Hierbei ergaben sich 2 interessante Befunde: Die Expression von SERCA war nicht vermindert, sondern sogar leicht erhöht. Es zeigte sich eine stark verminderte Expression von Junctin. Die nachfolgende schematische Darstellung gibt einen Überblick über die beobachteten Veränderungen:

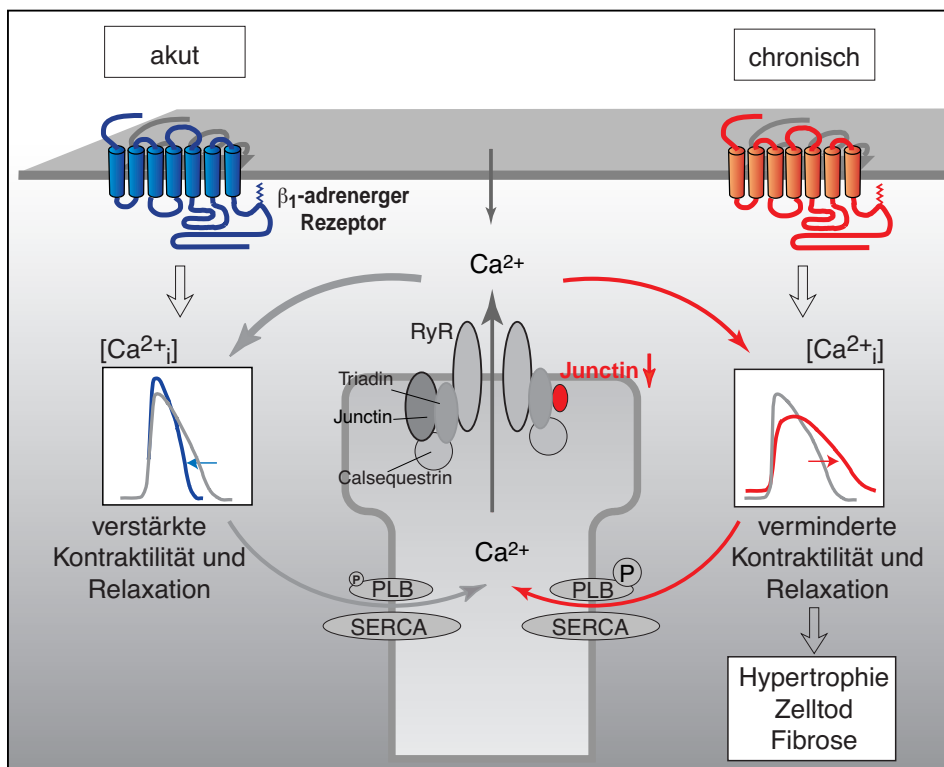


Abb. 45. Die Expression Calcium-regulierender Proteine in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen.

Diese Expressionsverminderung von Junctin ist die einzige auffällige Veränderung der untersuchten Calcium-regulierenden Proteine in diesem frühen Stadium der Insuffizienzentwicklung. Ob dies ursächlich für die Störung des Calciumtransienten verantwortlich ist, muß gegenwärtig noch unklar bleiben. Ähnliche Verminderungen der Junctin-Expression wurden lediglich in 2 transgenen Mauslinien mit kardialer Triadin- und Calsequestrin-Überexpression beobachtet (Kirchhefer et al., 2000; Sato et al., 1998). Bei der menschlichen Herzinsuffizienz und in Herzinsuffizienzmodellen ist die Expression von Junctin bislang noch nicht untersucht worden. In einem frühen Stadium der kompensierten Hypertrophie ist sie jedoch noch unverändert (Shorofsky et al., 1999). Dies deutet darauf hin, daß der Veränderung der Junctin-Expression eine Bedeutung im Verlauf der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zukommen könnte. In diesem Zusammenhang sind gegenwärtig noch mehrere Fragen offen, die der Klärung bedürfen.

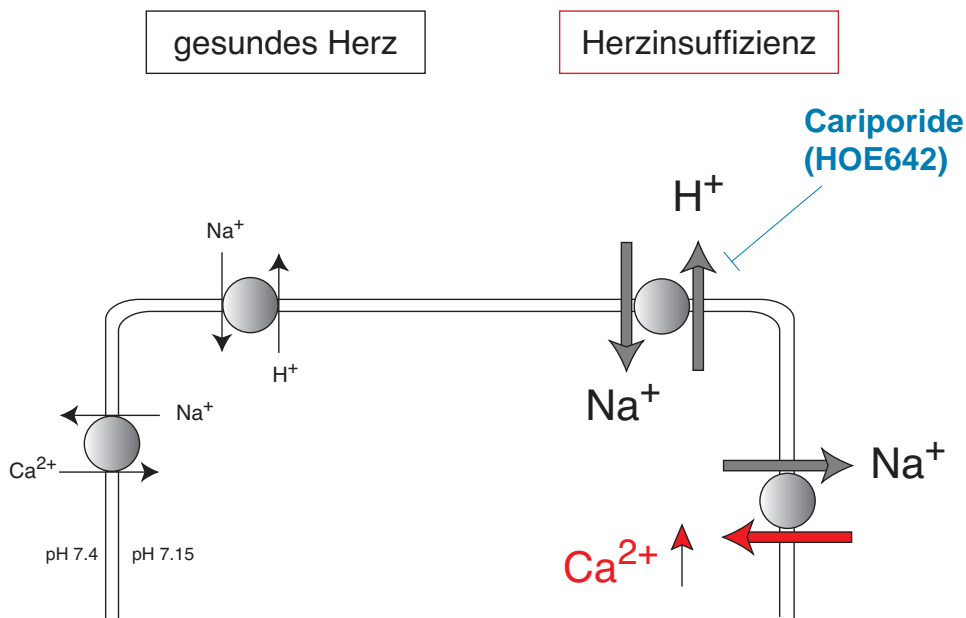
-Es gibt bislang lediglich Messungen der Kinetik des intrazellulären Calciumtransienten. Um die Höhe des diastolischen Calciums zu bestimmen, sind Absolutbestimmungen der Calciumkonzentration notwendig.

-Die Bedeutung der verminderten Junctin-Expression wird man erst nach Bestimmung der Junctin-Expression in humanem Myokard von Herzinsuffizienzpatienten und nach Charakterisierung der bereits generierten Junctin-transgenen Mäuse bestimmen können.

-Welche Bedeutung der Störung des intrazellulären Calciumtransienten zukommt, kann letztlich nur durch einen selektiven Eingriff in den zellulären Calciumhaushalt geklärt werden. Dazu wurden kürzlich Versuche begonnen, in denen  $\beta_1$ -transgene Mäuse mit Phospholamban-Knockout-Mäusen gekreuzt wurden.

Neue Ansätze für die Therapie der Herzinsuffizienz könnten sich aus den Befunden zur Rolle des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers in der Herzinsuffizienz ergeben. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß der kardiale  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher an den schädlichen Auswirkungen chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation maßgeblich beteiligt ist. Die Hauptergebnisse sind dabei: 1) die Behandlung mit einem spezifischen Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers hemmt die  $\beta$ -adrenerg induzierte Kardiomyozytenhypertrophie, 2) durch Blockade des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers kann die Entstehung interstitieller Fibrose in  $\beta_1$ -transgenen Tieren verhindert werden,

3) die Entwicklung einer Herzinsuffizienz kann durch Blockade des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers gehemmt werden. Die Grundlage für die Untersuchung des kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher im Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz bildeten mehrere interessante Vorbefunde. Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher wurde insbesondere im Kontext myokardialer Ischämie näher untersucht (Avkiran, 2001). Die bei kardialer Ischämie stattfindende Aktivierung des NHE ist kausal mit der auf die Ischämie folgenden Calciumüberladung in Verbindung gebracht worden (Lazdunski et al., 1985). Dabei soll die durch die vermehrte Aktivität des NHE erhöhte Konzentration von intrazellulärem Natrium gegen extrazelluläres Calcium ausgetauscht werden (sog. Reverse Mode des kardialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers).



**Abb. 46. Postulierter Wirkmechanismus von Cariporide bei Herzinsuffizienz.** Die Aktivierung des kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers reguliert den intrazellulären pH, indem er Protonen im Austausch gegen Natrium-ionen aus der Zelle herausbefördert. Die erhöhte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers in der Herzinsuffizienz könnte zu einer erhöhten Natriumbelastung führen, die wiederum in einer Überladung der Kardiomyozyten mit Calcium resultiert.

Es konnte nun gezeigt werden, daß eine Behandlung mit Inhibitoren des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers die schädliche Calciumüberladung der Kardiomyozyten verhindern kann und daß zudem die Folgen eines experimentellen Myokardinfarkts deutlich abgemildert werden können (Stromer et al., 2000). Dieses therapeutische Konzept wurde kürzlich auf die Anwendung am Menschen übertragen. Cariporide wurde dabei gezielt zur Protektion während einer voraussehbaren Ischämiephase

(Ballondilatation einer Koronararterie) eingesetzt und diese Therapie ergab eine Verbesserung mehrerer funktioneller Parameter (Rupprecht et al., 2000). Ein der ischämischen Calciumüberladung ähnliches Phänomen ist wahrscheinlich auch in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bedeutsam. Auch dort kommt es zu einer Störung des intrazellulären Kalziumtransienten mit einer Erhöhung der diastolischen Calciumkonzentration (Beuckelmann et al., 1992). Die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Herzhypertrophie, insbesondere wahrscheinlich durch die Aktivierung Calcium-abhängiger Transkriptionsfaktoren (Frey et al., 2000). Es erscheint also denkbar, daß die pharmakologische Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers durch Cariporide zu einer Reduktion der Calcium-„Belastung“ der Kardiomyozyten in den  $\beta_1$ -transgenen Mäusen geführt hat und daß dies dem therapeutischen Erfolg zugrunde liegt.

Es ist gegenwärtig noch weitgehend unklar, ob die Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren zu einer Veränderung der Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers führt. Es ist eher unwahrscheinlich, daß chronische Stimulation kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren *direkt* zu einer Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers führt, da eine kurzzeitige  $\beta$ -adrenerge Stimulation den kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher in Meerschweinchen- und Ratten-Kardiomyozyten hemmt (Desilets et al., 1994; Lagadic-Gossmann und Vaughan-Jones, 1993). Es scheint sich eher um eine indirekte Stimulation der NHE-Aktivität zu handeln oder aber die basale Aktivität des Austauschers ist ausreichend um maßgeblich zur Ausbildung des beobachteten Phänotyps beizutragen. Eine Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers könnte insbesondere durch zytosolisches Calcium erfolgen, da die Calciumtransienten isolierter Kardiomyozyten von  $\beta_1$ -transgenen Mäusen eine deutliche Störung aufweisen. Der verzögerte Rücktransport in das sarcoplasmatische Retikulum in der Diastole könnte zu einer Calmodulin-abhängigen Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers führen (Bertrand et al., 1994; Weissberg et al., 1989). Dabei bindet das aktivierte Calmodulin an eine Calmodulin-Bindungsstelle im intrazellulären Teil des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und führt so zu einer Disinhibition der NHE-Aktivität (Übersicht der NHE-Regulation bei (Karmazyn et al., 1999)). Aus den bisherigen Ergebnissen ergeben sich eine Reihe von interessanten Fragen, die untersucht werden müssen: Kommt es unter der Therapie mit Hemmstoffen des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers zu einer Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration?

Unterscheiden sich  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptor-überexprimierende Mäuse hinsichtlich der Aktivität des myokardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und erklären sich daraus eventuell Unterschiede im Phänotyp?

Sind die Expression und die Aktivität des kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers verändert?

Lassen sich auch bereits erkrankte Tiere erfolgreich therapieren?

Gibt es eventuell doch eine direkte Stimulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers durch die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren, die in den bisher publizierten Arbeiten übersehen wurde?

Von der Beantwortung dieser Fragen wird es unter anderem abhängen, ob es sich bei den günstigen Effekten der Therapie mit Cariporide um einen therapeutischen Mechanismus handelt, der generell in der Herzinsuffizienz wirksam ist, oder um einen Aspekt, der spezifisch die Folgen chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation betrifft. Nicht zuletzt aufgrund seiner ausgezeichneten Langzeitverträglichkeit von Cariporide könnte die Therapie mit Inhibitoren des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers ein neues therapeutisches Prinzip in der Herzinsuffizienztherapie begründen.



## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion kardialer  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren mit Hilfe einer Kombination aus transgenen Mausmodellen und physiologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht.

Durch gezielte Überexpression des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors im Herzen transgener Mäuse konnte gezeigt werden, daß die chronische Aktivierung dieses Rezeptors eine trophische Wirkung auf die Herzmuskelzellen hat. Über einen Zeitraum von mehreren Monaten führte dies zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. In der menschlichen Herzinsuffizienz kommt es zu einem ähnlichen Phänomen: Durch deutlich erhöhte Freisetzung von endogenen Katecholaminen kommt es zu einer chronischen Dauerstimulation kardialer  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren. Daß diese schädlich ist belegen das hier beschriebene Mausmodell und zudem einige neuere klinische Studien, die zeigen daß eine pharmakologische Blockade  $\beta$ -Rezeptoren zu einer Verminderung der Herzinsuffizienz mortalität führt.

Dieses Mausmodell erlaubte es erstmals den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor hinsichtlich seiner spontanen Rezeptoraktivität in einem physiologischen Modell zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß der humane  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor spontane Aktivität aufweist, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor. Dies könnte klinisch relevant sein, da klinisch verwendete  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten die spontane Aktivität des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in unserem Modell unterschiedlich stark unterdrückten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem untersucht, ob sich die beiden kardial exprimierten  $\beta$ -Rezeptor-Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  hinsichtlich ihrer Signaltransduktion unterscheiden. Ausgehend von dem Befund, daß die chronische Aktivierung der beiden Subtypen in transgenen Mausmodellen zu deutlich unterschiedlichen Phänotypen führt, wurden verschiedene intrazelluläre Signalwege auf ihre Aktivierung hin überprüft. Abweichend von publizierten, *in vitro* nach kurzzeitiger Rezeptorstimulation erhobenen Daten zeigte sich, daß die chronische Aktivierung der beiden Rezeptorsubtypen zu einer unterschiedlichen Aktivierung der kardialen MAP-kinasen (ERK) führt. Die  $\beta_1$ -spezifische Aktivierung dieser Kinasen könnte die beobachtete unterschiedliche Hypertrophieentwicklung in diesen beiden Mausmodellen erklären.

Einen weiteren Schwerpunkt bei der Aufklärung des Mechanismus  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie bildete die Untersuchung der zellulären Calcium-homöostase. Als früheste funktionelle Veränderung in der Entwicklung einer  $\beta$ -adrenerg induzierten Herzhypertrophie und –insuffizienz trat dabei eine Störung des intrazellulären Calciumtransienten auf. Als möglicher Mechanismus für die Störung des Calciumhaushalts konnte eine zeitgleich auftretende veränderte Expression des Calcium-regulierenden Proteins Junctin beschrieben werden.

Einen neuen therapeutischen Ansatz für die Therapie der Herzinsuffizienz könnten schließlich vielleicht die Untersuchungen zum kardialen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher ergeben: Es konnte erstmals gezeigt werden, daß der kardiale  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher maßgeblich an der  $\beta$ -adrenerg induzierten Herzhypertrophie- und Fibrose-entstehung beteiligt ist und daß die pharmakologische Inhibition dieses Proteins sowohl Hypertrophie als auch die Fibrose wirksam unterdrücken kann.

## ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCH

We investigated the function of cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors by combining transgenic mouse models and molecular biology and biochemical methods.

By targeted overexpression of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor in the hearts of transgenic mice we could demonstrate that chronic activation of this receptor mediates cardiac hypertrophy. Within several months  $\beta_1$ -transgenic mice developed heart failure. A similar mechanism occurs in human heart failure: Marked elevation of catecholamine release leads to chronic stimulation of cardiac  $\beta_1$ -adrenergic receptors. Both our mouse model and recent clinical studies that showed clinical benefit from  $\beta$ -blockade in heart failure demonstrate that this chronic stimulation is detrimental.

This transgenic mouse represents the first model to study the spontaneous activity of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor in a physiological model. We found that the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor displays spontaneous activity, however to a much lesser extent than the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. This could be of clinical relevance, as clinically used  $\beta$ -blockers differed in their ability to suppress the spontaneous activity of the  $\beta_1$ -adrenergic receptor in our model.

We further investigated, whether the two cardiac  $\beta$ -receptor subtypes  $\beta_1$  and  $\beta_2$  differ in their intracellular signalling properties. Upon cardiac overexpression in transgenic mice the two receptor subtypes lead to different phenotypes. In contrast to previously published data from in vitro studies using isolated cells, we found that chronic activation of the receptor subtypes leads to differential activation of cardiac MAP-kinases (ERK). The  $\beta_1$ -specific activation of this kinase could explain the different hypertrophy response in both mouse models.

We further studied the involvement of intracellular calcium handling in the development of  $\beta$ -adrenergic induced cardiac hypertrophy. We found impairment of the intracellular calcium transient very early in the course of the disease. This correlated with the decrease of the expression of junctin, a calcium-regulatory protein in the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Finally we investigated the role of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger in the development of adrenergically induced hypertrophy and heart failure. We could demonstrate, that the cardiac  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger is involved in the development of cardiac hypertrophy

and fibrosis resulting from  $\beta$ -adrenergic stimulation. Pharmacologic inhibition of this protein could represent a novel therapeutic principle in the therapy of heart failure.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Adie, E.J., Milligan, G. (1994) Agonist regulation of cellular Gs  $\alpha$ -subunit levels in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells transfected to express different levels of the human  $\beta_2$ -adrenoceptor. *Biochem J*, **300**, 709-15.
- Akhter, S.A., Skaer, C.A., Kypson, A.P., McDonald, P.H., Peppel, K.C., Glower, D.D., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J. (1997) Restoration of  $\beta$ -adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12100-5.
- Alquist, R.P. (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol*, **153**, 586-600.
- Altschuld, R.A., Starling, R.C., Hamlin, R.L., Billman, G.E., Hensley, J., et al. (1995) Response of failing canine and human heart cells to  $\beta_2$ -adrenergic stimulation. *Circulation*, **92**, 1612-8.
- Anversa, P., Kajstura, J., Olivetti, G. (1996) Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol*, **11**, 245-51.
- Australia/New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group (1997) Randomised, placebo-controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease. *Lancet*, **349**, 375-80.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1995) *Short protocols in molecular biology*. John Wiley.
- Avkiran, M. (2001) Protection of the ischaemic myocardium by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol*, **96**, 306-11.
- Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J., Shigekawa, M. (1994) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem*, **269**, 13703-9.
- Beuckelmann, D.J., Nabauer, M., Erdmann, E. (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, **85**, 1046-55.
- Bisognano, J.D., Weinberger, H.D., Bohlmeyer, T.J., Pende, A., Reynolds, M.V., et al. (2000) Myocardial-directed overexpression of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 817-30.
- Bond, R.A., Leff, P., Johnson, T.D., Milano, C.A., Rockman, H.A., et al. (1995) Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the  $\beta_2$ -adrenoceptor. *Nature*, **374**, 272-6.
- Bristow, M.R. (1993) Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J*

*Am Coll Cardiol*, **22**, 61A-71A.

- Bristow, M.R. (2000)  $\beta$ -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*, **101**, 558-69.
- Bristow, M.R., Anderson, F.L., Port, J.D., Skerl, L., Hershberger, R.E., et al. (1991) Differences in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **84**, 1024-39.
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., Lurie, K., Billingham, M.E., Harrison, D.C., Stinson, E.B. (1982) Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, **307**, 205-11.
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., et al. (1986)  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down- regulation in heart failure. *Circ Res*, **59**, 297-309.
- Bristow, M.R., Hershberger, R.E., Port, J.D., Minobe, W., Rasmussen, R. (1989)  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol*, **35**, 295-303.
- Bristow, M.R., Minobe, W.A., Raynolds, M.V., Port, J.D., Rasmussen, R., Ray, P.E., Feldman, A.M. (1993) Reduced  $\beta_1$ -receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest*, **92**, 2737-45.
- Brodde, O.E. (1993)  $\beta$ -adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther*, **60**, 405-30.
- Brodde, O.E., Michel, M.C. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*, **51**, 651-90.
- Bueno, O.F., De Windt, L.J., Lim, H.W., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Molkentin, J.D. (2001) The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res*, **88**, 88-96.
- Buxton, I.L., Brunton, L.L. (1985) Direct analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. *Circ Res*, **56**, 126-32.
- Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R.P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., Crow, M.T. (2000) The  $\beta_2$ -adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res*, **87**, 1172-9.
- Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., Bouvier, M. (1994) Inverse agonist activity of  $\beta$ -adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol*, **45**, 490-9.
- Chidsey, C.A., Braunwald, E. (1966) Sympathetic activity and neurotransmitter depletion in congestive heart failure. *Pharmacol Rev*, **18**, 685-700.

- CIBIS II Investigators and Committees (1990) The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*, **353**, 9-13.
- Communal, C., Colucci, W.S., Singh, K. (2000) p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against  $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem*, **275**, 19395-400.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S. (1999) Opposing effects of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Circulation*, **100**, 2210-2.
- Dandona, P., Karne, R., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Magsino, C.H., Jr. (2000) Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation*, **101**, 122-4.
- Danner, S., Frank, M., Lohse, M.J. (1998) Agonist regulation of human  $\beta_2$ -adrenergic receptor mRNA stability occurs via a specific AU-rich element. *J Biol Chem*, **273**, 3223-9.
- de Ligt, R.A., Kourounakis, A.P., AP, I. (2000) Inverse agonism at G-protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol*, **130**, 1-12.
- De Windt, L.J., Lim, H.W., Bueno, O.F., Liang, Q., Delling, U., et al. (2001) Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy invivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3322-3327.
- del Monte, F., Harding, S.E., Schmidt, U., Matsui, T., Kang, Z.B., Dec, G.W., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., Hajjar, R.J. (1999) Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation*, **100**, 2308-11.
- Desilets, M., Puceat, M., Vassort, G. (1994) Chloride dependence of pH modulation by  $\beta$ -adrenergic agonist in rat cardiomyocytes. *Circ Res*, **75**, 862-9.
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, **321**, 75-9.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., Smithies, O. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **330**, 576-8.
- Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, A.D. (1989) Molecular characterization of the human  $\beta$ -adrenergic receptor. *Science*, **245**, 1118-21.
- Engelhardt, S., Bohm, M., Erdmann, E., Lohse, M.J. (1996) Analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **27**, 146-54.

- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., Lohse, M.J. (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7059-64.
- Feldman, A.M., Cates, A.E., Veazey, W.B., Hershberger, R.E., Bristow, M.R., Baughman, K.L., Baumgartner, W.A., Van Dop, C. (1988) Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G-protein) in the failing human heart. *J Clin Invest*, **82**, 189-97.
- Feuerstein, G., Shusterman, N.H., Ruffolo, R.R. (1997) Carvedilol update IV: prevention of oxidative stress, cardiac remodeling and progression of congestive cardiac failure. *Drugs Today*, **33**, 453-473.
- Francis, S.H., Corbin, J.D. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol*, **56**, 237-72.
- Freissmuth, M., Selzer, E., Marullo, S., Schutz, W., Strosberg, A.D. (1991) Expression of two human  $\beta$ -adrenergic receptors in Escherichia coli: functional interaction with two forms of the stimulatory G-protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8548-52.
- Frey, N., McKinsey, T.A., Olson, E.N. (2000) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med*, **6**, 1221-7.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., Le Marec, H. (1998) The negative inotropic effect of  $\beta_3$ -adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*, **102**, 1377-84.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., Le Marec, H. (1996) Functional  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, **98**, 556-62.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7380-4.
- Gross, W., Lohse, M.J. (1991) Mechanism of activation of A2 adenosine receptors. II. A restricted collision-coupling model of receptor-effector interaction. *Mol Pharmacol*, **39**, 524-30.
- Hadcock, J.R., Ros, M., Malbon, C.C. (1989a) Agonist regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. Analysis in S49 mouse lymphoma mutants. *J Biol Chem*, **264**, 13956-61.
- Hadcock, J.R., Wang, H.Y., Malbon, C.C. (1989b) Agonist-induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem*, **264**, 19928-33.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., et al. (1998) The  $\beta_2$ -adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature*, **392**, 626-30.



- Harding, V.B., Jones, L.R., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., Rockman, H.A. (2001) Cardiac  $\beta$ ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5809-14.
- Hoit, B.D. (2001) New approaches to phenotypic analysis in adult mice. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 27-35.
- Howard, A.D., McAllister, G., Feighner, S.D., Liu, Q., Nargund, R.P., Van der Ploeg, L.H., Patchett, A.A. (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 132-40.
- Hunter, J.J., Chien, K.R. (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*, **341**, 1276-83.
- Jahns, R., Boivin, V., Siegmund, C., Inselmann, G., Lohse, M.J., Boege, F. (1999) Autoantibodies activating human  $\beta_1$ -adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation*, **99**, 649-54.
- James, J.F., Hewett, T.E., Robbins, J. (1998) Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res*, **82**, 407-15.
- Karmazyn, M., Gan, X.T., Humphreys, R.A., Yoshida, H., Kusumoto, K. (1999) The myocardial  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res*, **85**, 777-86.
- Kass, D.A., Hare, J.M., Georgakopoulos, D. (1998) Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res*, **82**, 519-22.
- Kilts, J.D., Gerhardt, M.A., Richardson, M.D., Sreeram, G., Mackensen, G.B., et al. (2000)  $\beta_2$ -adrenergic and several other G-protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res*, **87**, 705-9.
- Kim, C.M., Dion, S.B., Benovic, J.L. (1993) Mechanism of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase activation by G-proteins. *J Biol Chem*, **268**, 15412-8.
- Kirchhefer, U., Neumann, J., Baba, H.A., Begrow, F., Kobayashi, Y.M., Reinke, U., Schmitz, W., Jones, L.R. (2000) Cardiac Hypertrophy and Impaired Relaxation in Transgenic Mice Overexpressing Triadin 1. *J Biol Chem*.
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Inglese, J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G-protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem*, **269**, 6193-7.
- Lagadic-Gossmann, D., Vaughan-Jones, R.D. (1993) Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoceptors. *J Physiol*, **464**, 49-73.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Lazdunski, M., Frelin, C., Vigne, P. (1985) The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in

- regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*, **17**, 1029-42.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudeira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2000) *Molecular cell biology*. Freeman, New York.
- Lohse, M.J. (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta*, **1179**, 171-88.
- Lowes, B.D., Simon, M.A., Tsvetkova, T.O., Bristow, M.R. (2000) Inotropes in the  $\beta$ -blocker era. *Clin Cardiol*, **23**, III11-6.
- Maack, C., Cremers, B., Flesch, M., Hoper, A., Sudkamp, M., Bohm, M. (2000) Different intrinsic activities of bucindolol, carvedilol and metoprolol in human failing myocardium. *Br J Pharmacol*, **130**, 1131-9.
- Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-85.
- Mason, D.A., Moore, J.D., Green, S.A., Liggett, S.B. (1999) A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **274**, 12670-4.
- Mercadier, J.J., Lompre, A.M., Duc, P., Boheler, K.R., Fraysse, J.B., Wisnewsky, C., Allen, P.D., Komajda, M., Schwartz, K. (1990) Altered sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*, **85**, 305-9.
- MERIT-HF Study group (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*, **353**, 2001-7.
- Mewes, T., Dutz, S., Ravens, U., Jakobs, K.H. (1993) Activation of calcium currents in cardiac myocytes by empty  $\beta$ -adrenoceptors. *Circulation*, **88**, 2916-22.
- Milano, C.A., Allen, L.F., Rockman, H.A., Dolber, P.C., McMinn, T.R., Chien, K.R., Johnson, T.D., Bond, R.A., Lefkowitz, R.J. (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Science*, **264**, 582-6.
- Milligan, G., Bond, R.A., Lee, M. (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 10-3.
- Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C.A., Frank, K., et al. (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*, **99**, 313-22.
- Miyamoto, M.I., del Monte, F., Schmidt, U., DiSalvo, T.S., Kang, Z.B., et al. (2000) Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 793-8.

- Molenaar, P., Bartel, S., Cochrane, A., Vetter, D., Jalali, H., et al. (2000) Both  $\beta_2$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptors mediate hastened relaxation and phosphorylation of phospholamban and troponin I in ventricular myocardium of Fallot infants, consistent with selective coupling of  $\beta_2$ -adrenergic receptors to G(s)-protein. *Circulation*, **102**, 1814-21.
- Molkentin, J.D., Dorn, I.G., 2nd. (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, **63**, 391-426.
- Mombaerts, P. (1999) Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 315-20.
- Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J.N., Gauthier, C., Balligand, J.L. (2001) Upregulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, **103**, 1649-55.
- Morisco, C., Zebrowski, D.C., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Sadoshima, J. (2001)  $\beta$ -adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the  $\beta_1$ -subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 561-73.
- Muller, J., Wallukat, G., Dandel, M., Bieda, H., Brandes, K., Spiegelsberger, S., Nissen, E., Kunze, R., Hetzer, R. (2000) Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **101**, 385-91.
- Neumann, J., Schmitz, W., Scholz, H., von Meyerinck, L., Doring, V., Kalmar, P. (1988) Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. *Lancet*, **2**, 936-7.
- Packer, M., Bristow, M.R., Cohn, J.N., Colucci, W.S., Fowler, M.B., Gilbert, E.M., Shusterman, N.H. (1996) The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*, **334**, 1349-55.
- Packer, M., Coats, A.J., Fowler, M.B., Katus, H.A., Krum, H., et al. (2001) Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, **344**, 1651-8.
- Palakodeti, V., Oh, S., Oh, B.H., Mao, L., Hongo, M., Peterson, K.L., Ross, J., Jr. (1997) Force-frequency effect is a powerful determinant of myocardial contractility in the mouse. *Am J Physiol*, **273**, H1283-90.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300**, 611-5.
- Port, J.D., Bristow, M.R. (2001) Altered  $\beta$ -adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 887-905.
- Rao, S., Verkman, A.S. (2000) Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C1-C18.
- Rockman, H.A., Chien, K.R., Choi, D.J., Iaccarino, G., Hunter, J.J., Ross, J., Jr., Lefkowitz, R.J., 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**, 7000-5.
- Rohrer, D.K., Desai, K.H., Jasper, J.R., Stevens, M.E., Regula, D.P., Jr., Barsh, G.S., Bernstein, D., Kobilka, B.K. (1996) Targeted disruption of the mouse  $\beta_1$ -adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7375-80.
- Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980) Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem*, **49**, 533-64.
- Rupprecht, H.J., vom Dahl, J., Terres, W., Seyfarth, K.M., Richardt, G., Schultheis, H.P., Buerke, M., Sheehan, F.H., Drexler, H. (2000) Cardioprotective effects of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*, **101**, 2902-8.
- Ruwhof, C., van der Laarse, A. (2000) Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*, **47**, 23-37.
- Sato, Y., Ferguson, D.G., Sako, H., Dorn, G.W., 2nd, Kadambi, V.J., Yatani, A., Hoit, B.D., Walsh, R.A., Kranias, E.G. (1998) Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac caldesmon is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*, **273**, 28470-7.
- Schafer, M., Frischkopf, K., Taimor, G., Piper, H.M., Schluter, K.D. (2000) Hypertrophic effect of selective  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C495-503.
- Shorofsky, S.R., Aggarwal, R., Corretti, M., Baffa, J.M., Strum, J.M., et al. (1999) Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circ Res*, **84**, 424-34.
- Siegenthaler, W. (2001) *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Stromer, H., de Groot, M.C., Horn, M., Faul, C., Leupold, A., Morgan, J.P., Scholz, W., Neubauer, S. (2000)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of  $\text{Ca}^{2+}$  overload and prolonged acidosis on reperfusion. *Circulation*, **101**, 2749-55.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. Freeman, New York.
- Sugden, P.H., Clerk, A. (1998a) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*, **76**, 725-46.
- Sugden, P.H., Clerk, A. (1998b) "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*, **83**, 345-52.
- Swedberg, K., Eneroth, P., Kjeksus, J., Wilhelmsen, L. (1990) Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*, **82**, 1730-6.

- Tang, W.J., Gilman, A.G. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell*, **70**, 869-72.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**, 503-12.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J.S., Erdmann, E., Lohse, M.J. (1993) Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, **87**, 454-63.
- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E., Lefkowitz, R.J. (1996) Mitogenic signaling via G-protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, **17**, 698-714.
- Varma, D.R., Shen, H., Deng, X.F., Peri, K.G., Chemtob, S., Mulay, S. (1999) Inverse agonist activities of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists in rat myocardium. *Br J Pharmacol*, **127**, 895-902.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-51.
- Wallukat, G., Muller, J., Podlowski, S., Nissen, E., Morwinski, R., Hetzer, R. (1999) Agonist-like  $\beta$ -adrenoceptor antibodies in heart failure. *Am J Cardiol*, **83**, 75H-79H.
- Weissberg, P.L., Little, P.J., Cragoe, E.J., Jr., Bobik, A. (1989) The pH of spontaneously beating cultured rat heart cells is regulated by an ATP-calmodulin-dependent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiport. *Circ Res*, **64**, 676-85.
- White, D.C., Hata, J.A., Shah, A.S., Glower, D.D., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J. (2000) Preservation of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5428-33.
- Wiesmann, F., Ruff, J., Dienesch, C., Leupold, A., Rommel, E., Haase, A., Neubauer, S. (2000) Cardiovascular phenotype characterization in mice by high resolution magnetic resonance imaging. *Magma*, **11**, 10-5.
- Wiesmann, F., Ruff, J., Engelhardt, S., Hein, L., Dienesch, C., et al. (2001) Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice : acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. *Circ Res*, **88**, 563-9.
- Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group (1990) Xamoterol in severe heart failure. *Lancet*, **336**, 1-6.
- Xiao, R.P., Avdonin, P., Zhou, Y.Y., Cheng, H., Akhter, S.A., Eschenhagen, T., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., Lakatta, E.G. (1999) Coupling of  $\beta_2$ -adrenoceptor to  $G_i$  proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res*, **84**, 43-52.
- Xiao, R.P., Lakatta, E.G. (1993)  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation and  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  current in single rat ventricular cells. *Circ Res*, **73**, 286-300.

- Zaugg, M., Xu, W., Lucchinetti, E., Shafiq, S.A., Jamali, N.Z., Siddiqui, M.A. (2000)  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation*, **102**, 344-50.
- Zhou, Y.Y., Wang, S.Q., Zhu, W.Z., Chruscinski, A., Kobilka, B.K., et al. (2000a) Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H429-36.
- Zhou, Y.Y., Yang, D., Zhu, W.Z., Zhang, S.J., Wang, D.J., et al. (2000b) Spontaneous activation of  $\beta_2$ - but not  $\beta_1$ -adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from  $\beta_1\beta_2$ - double knockout mice. *Mol Pharmacol*, **58**, 887-94.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP – Adenosintriphosphat

cDNA-copyDNA

CTP – Cytosintriphosphat

ddH<sub>2</sub>O-doppelt destilliertes Wasser, Aqua bidest

GAPDH – Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase

GTP - Guanosintriphosphat

LB-Medium – Liquid Broth Medium zur Kultivierung von E. coli

mRNA-messenger RNA

MAP-Kinase – Mitogen activated protein kinase

PBS – Phosphate buffered saline

PCR-Polymerasekettenreaktion

RPA-RNAse Protection Assay

SDS - Sodiumdodecylsulfat

SSC – Standard Sodium Citrat

T3; T7- DNA-Erkennungssequenzen die von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen verwendet werden. T3/T7-Sequenzen sind in zahlreichen Klonierungsvektoren in den Endbereichen der multiplen Klonierungsstellen enthalten und werden häufig als universelle DNA-Sequenzen zum PCR-basierten Sequenzieren verwendet.

TA-Klonierung – Klonierung von auf ein überhängendes Adeninnukleotid endenden PCR-Produkten in einen ein überhängendes Thymidinnukleotid enthaltenden Klonierungsvektor.

TAE-Puffer – Elektrophoresepuffer der Tris, Essigsäure und EDTA enthält

TaqPolymerase – hitzebeständige DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*

UTP - Uridintriphosphat

## DANKSAGUNG

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse bedanken. Auch aufgrund seines persönlichen Rates fand ich nach dem klinischen Teil meiner Ausbildung wieder in die Forschung. Ich danke ihm sehr herzlich für die fortwährend ideenreiche, engagierte und sehr persönliche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn PD. Dr. Lutz Hein sei ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und insbesondere auch fortwährende Motivation gedankt. Ohne seinen Einsatz an Ideen, Zeit für Diskussionen und praktischer Zusammenarbeit im Labor wäre sehr vieles nicht möglich gewesen.

Im Labor möchte ich mich insbesondere bei Frau Monika Buitrago, Frau Yvonne Grimmer, Frau Sybille Kempter, Frau Ursula Keller, Herrn Florian Nickel und Frau Dr. Eva Schmitteckert und Frau Dr. Lydia Vlaskin für die engagierte Zusammenarbeit bei der Verwirklichung gemeinsamer Projekte bedanken.

Herrn Prof. Dr. Joachim Neumann, Herrn Dr. Peter Boknik und Herrn Frank Begro aus dem Institut für Pharmakologie in Münster sei für ihre Unterstützung bei der Aufklärung der Störung des zellulären Calciumhaushalts bei  $\beta_1$ -transgenen Tieren gedankt.

Mein Dank geht ferner an Herrn Prof. Dr. Axel Haase, Herrn Dr. Jan Ruff und Herrn Dr. Frank Wiesmann, die die NMR-Messungen an unseren transgenen Mäusen ermöglicht und durchgeführt haben.

Bei Herrn Dr. Holger Eickhoff und Herrn Dr. Aleksey Soldatov am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik darf ich mich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei der Durchführung der GeneArray-Experimente bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Heisenberg möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein persönlicher Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gezeigte Hilfsbereitschaft und ihr Engagement in wissenschaftlichen Diskussionen.



# LEBENS LAUF

Stefan Hanns ENGELHARDT

Adresse: Eichendorffstraße 4, 97072 Würzburg

Geboren: 4. Juni 1969 in München

Ausbildung:

Grundschule: 1975-1979 München

Gymnasium: 1979-1988 München

Abitur: 1988 München

Zivildienst: 1988 – 1989 Malteser Hilfsdienst

Universität: Studium der Humanmedizin

1989 - 1991 Universität Regensburg

1991 - 1996 Ludwig-Maximilians-Universität München

1996 Forschungsaufenthalt an der Harvard Medical School, Boston (Prof. R. Hajjar)

Medizinische Doktorarbeit:

Oktober 1992 - Juli 1995 Max-Planck-Institut für Biochemie,

Laboratorium für molekulare Biologie, Martinsried

Berufliche Tätigkeit:

1997 - 1998 Arzt im Praktikum am Institut für Pharmakologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Seit 1997 Teilnahme am MD/Phd-Programm der Universität Würzburg

1999 Approbation als Arzt

## Eigene Publikationen in Zusammenhang mit der vorgelegten Arbeit

Engelhardt S, Hein L, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. USA* 96, 7059-7064.

(Editorial zu dieser Arbeit: Limbird LE, Vaughan DE (1999). Augmenting beta receptors in the heart: Short-term gains offset by long-term pains?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7125-7127.)

Engelhardt S and Lohse MJ (2000) Determination of adrenergic receptor mRNAs by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reactions. *Methods Mol Biol.* 126, 155-68.

Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar, Lohse MJ (2001) Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double  $\beta_1/\beta_2$ -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of  $\beta_1$ -adrenoceptors for putative  $\beta_4$ -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363 87-93.

Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, Hein L, Dienesch C, Leupold A, Illinger R, Frydychowicz A, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Lohse MJ and Neubauer S (2001) Dobutamine stress magnetic resonance microimaging in mice: Acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. *Circ Res* 88 563-569.

Engelhardt S, Grimmer Y, Fan HG, Lohse MJ (2001) Constitutive activity of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Mol. Pharm* 60 1-6.

(Editorial zu dieser Arbeit: Port, J. D., Bristow, M. R. (2001).  $\beta_1$ -Adrenergic receptors, transgenic mice, and pharmacological model systems. *Mol Pharm* 60, 629-631)

Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, Hein L (2001) Impaired calcium handling and altered expression of the SR protein junctin in mice overexpressing the  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *FASEB Journal im Druck*

Brede M, Hadamek K, Meinel L, Wiesmann F, Peters J, Engelhardt S, Simm A, Haase A, Lohse MJ, Hein L (2001) Vascular hypertrophy and increased levels of phospho-P70S6 kinase in mice lacking angiotensin II AT2 receptors. *Circulation* im Druck.

#### Eingereichte Arbeiten

Engelhardt S, Hein L, Lohse MJ (2001) Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange prevents  $\beta_1$ -adrenergic receptor induced hypertrophy and fibrosis in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. *Eingereicht*

Eigenthaler M, Engelhardt S, Schinke B, Kobsar A, Schmitteckert E, Gambaryan S, Krenn V, Eliava M, Jarchau T, Lohse MJ, Walter U, Hein L (2001) Perinatal lethality and bradycardia of transgenic mice with cardiac overexpression of a dominant-negative EVH1-domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Eingereicht*

#### Buchbeiträge

Lohse MJ, Engelhardt S (2000) Cardiac overexpression of  $\beta$ -adrenergic receptors. In *Molecular approaches to heart failure therapy*, E. Marban, G. Hasenfuss (Hrsg.), Darmstadt: Steinkopf-Verlag.

Engelhardt S, Lohse MJ (2001) Molekularbiologische Grundlagen. In *Handbuch der Gentherapie*, H. von der Leyen (Hrsg.), Berlin: Springer-Verlag.

Würzburg, den 6. Oktober 2001

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre hiermit, daß die Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre ferner, an der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg promoviert zu haben (Dr. med.).