

Aus der Medizinischen Klinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Integrinaktivierung und Formation des  
„fokalen Adhäsionskomplexes“  
im Hypertrophieprozess adulter Mäuseherzen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Michael Joner**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2003**

Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Strotmann  
Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

**Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2004**

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Klinischer und experimenteller Hintergrund .....	1
1.1.1 Entstehung der Herzhypertrophie .....	4
1.2 Molekularbiologischer Hintergrund .....	6
1.3 Aufbau und Funktion der Integrine .....	11
1.4 Herzhypertrophie im Tiermodell .....	14
1.4.1 Tiermodelle im Allgemeinen .....	14
1.4.2 Tiermodelle in der klinischen Forschung .....	15
1.5 Herstellung von knock-out-Mauslinien .....	15
1.6 Integrin alpha.v/beta.5-Inhibition .....	17
1.7 Fragestellung .....	19
2 Methodik .....	20
2.1 Mausmodell Aortenkonstriktion .....	20
2.1.1 Hämodynamische und morphologische Untersuchungen .....	20
2.1.2 Gewebepräparation .....	21
2.2 Western Blot .....	22
2.3 Herstellung von Mauslinien mit konditionalem beta.1- Integrin-knock-out .....	24
2.3.1 Isolierung der DNA zur Genotypisierung .....	25
2.3.2 Genotypisierung durch PCR .....	26
2.4 Integrin alpha.v/beta.5-Inhibition in vivo .....	28
3 Ergebnisse .....	32
3.1 Genotypisierung der Mäusezucht mittels PCR .....	32
3.2 Morphologische und hämodynamische Charakterisierung .....	34
3.3 Western-Blot-Analysen .....	38
3.5 In vitro Assay .....	41
4 Diskussion .....	44
4.1 Diskussion des Tiermodells .....	44
4.1.1 Grenzen des Mausmodells .....	44
4.2 Linksventrikuläre Drucküberlastung an Mäuseherzen .....	45
4.3 Herstellung von konditionalen knock-out-Mäusen .....	49
4.4 Inhibierung des alpha.v/beta.5-Integrins .....	52
5 Zusammenfassung .....	54
6 Literaturverzeichnis .....	55
7 Anhang .....	60
7.1 Abkürzungen .....	60
7.2 Lösungen .....	61
7.3 Chemikalien, Materialien und Fertig-Kits .....	64
7.4 Geräte .....	65

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinischer und experimenteller Hintergrund

Viele verschiedene Grunderkrankungen des Herz-Kreislaufsystems führen zu einer Druck- oder Volumenbelastung des Herzens mit kompensatorischer Hypertrophie des Herzmuskels. Bei Druckbelastung kommt es zu einer Zunahme der Wandspannung, die den Hypertrophieprozess auslöst. Die Wandspannung lässt sich nach der Formel des französischen Mathematikers und Physikers *Laplace* folgendermaßen berechnen:

$$K = P_{tm} \cdot r / 2d \text{ (n} \cdot \text{m}^{-2}\text{)}$$

Man geht vereinfacht davon aus, dass das Herz ein kugelförmiger Hohlkörper ist. Dabei ist  $r$  (m) der Innenradius,  $d$  (m) die Wanddicke und  $P_{tm}$  (Pa) der transmurale Druck, der normalerweise dem Innendruck entspricht. Die Wandspannung  $K$ , d.h. der Kraft/Wandquerschnitt ( $\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$ ), nimmt proportional mit dem Innendruck und dem Radius zu. Daher gilt auch: Je dicker die Wand, desto geringer ist bei gleichem Innenradius die Wandspannung.

Da sich die einzelne Herzmuskelzelle nach dem Neonatalstadium nicht mehr wesentlich teilen kann, ist das Herz zur Konstanthaltung der Wandspannung auf eine Hypertrophie angewiesen. Kommt es zum Beispiel zu einem Herzinfarkt, fällt ein Teil des Arbeitsmyokards aus und steht dem Herzen zur Erhaltung seiner Pumpfunktion nicht mehr zu Verfügung. Dadurch kommt es zu Druck- und Volumenbelastung des Herzens. Es kompensiert diesen Ausfall durch eine Hypertrophie des umliegenden Muskelgewebes. Diese initiale Hypertrophie verbessert die Herzfunktion anfangs, zu einem späteren Zeitpunkt kommt es jedoch oft zur zunehmenden Dilatation des Ventrikels und damit zum Anstieg der Wandspannung. Schließlich leitet dieser Prozess die Entwicklung einer irreversiblen Herzinsuffizienz ein. Bis heute sind die Vorgänge, die diesen Übergang zur Dekompensation steuern, nicht im Einzelnen bekannt. Integrine spielen dabei möglicherweise eine entscheidende Rolle. Sie übertragen zum einen den physikalischen Stimulus während der Hypertrophie auf die einzelne Herzmuskelzelle. Darüber hinaus sind sie entscheidende Schaltstationen im Signaltransduktionsprozess des Herzmuskels. Möglicherweise verbinden sie diese beiden Schritte entscheidend

miteinander. Dies legt den Gedanken nahe, durch pharmakologische Beeinflussung verschiedener Integrinunterformen therapeutischen Nutzen zu erlangen. In vielen Bereichen der Medizin spielt diese Interaktion zwischen Wirkstoff und Integrinen schon heute eine große Rolle. Darüber hinaus gibt es einige interessante experimentelle Ansätze, die in Zukunft zur Therapie von Erkrankungen eingesetzt werden könnten.

Im Bereich der kardiovaskulären Medizin hat die Integrininhibition ( $\alpha$ .IIb/ $\beta$ .3, identisch mit Glykoprotein IIb/IIIa) am Thrombozyten therapeutischen Nutzen erlangt. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper (z.B. Abciximab) oder synthetischer Rezeptorantagonisten (z.B. Tirofiban, Eptifibatide) konnte das Infarktrisiko bei instabiler Angina pectoris und Komplikationen nach Ballondilatation und PTCA erheblich gesenkt werden [1].

Beim akuten Koronarsyndrom haben die synthetischen Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten eine positive Wirkung. Es konnte gezeigt werden, dass besonders bei Infarkten mit und ohne persistierende ST-Streckenhebungen ein Nutzen von Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten zu verzeichnen ist. Insbesondere profitieren Patienten mit hohem Risiko (rezidivierende Brustschmerzen, dynamische ST-Streckenveränderungen, ST-Streckensenkungen usw.) sowie Patienten mit erhöhten Troponinwerten. Dieser Nutzen kommt besonders dann zum Tragen, wenn innerhalb der ersten 48 Stunden eine Koronarangiographie mit eventueller Intervention erfolgt. Dies gilt auch für eine sich anschließende Herzbybypassoperation. Des Weiteren wird empfohlen, die Medikation mit Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten für 24 Stunden nach Intervention fortzuführen [2].

Im Bereich der Onkologie versucht man seit langem, die für die Malignisierung eines Tumors notwendige Angiogenese mit Hilfe bestimmter Substanzen zu verhindern. Diese Angiogenese spielt die Schlüsselrolle bei der Entstehung vieler maligner Erkrankungen [3]. Integrine spielen bei der Angiogenese eine wichtige Rolle. Insbesondere die Unterformen  $\alpha$ .v/ $\beta$ .3 sowie  $\alpha$ .v/ $\beta$ .5, welche auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert sind, werden mittlerweile pharmakologisch erfolgreich blockiert. Das  $\alpha$ .v/ $\beta$ .3-Integrin garantiert das Wachstum der Blutgefäße und trägt somit auch zur Metastasierung maligner Tumoren bei [4]. Es gibt bisweilen eine ganze Reihe an Substanzen, welche die Angiogenese hemmen. Mit Erfolg sind diese Substanzen schon als Alternative bei malignen Tumoren angewendet worden, die

nicht auf eine konventionelle Chemotherapie ansprechen [5]. Cilengitide ist ein zyklisches Peptid, welches  $\alpha.v/\beta.3$  sowie  $\alpha.v/\beta.5$ -Integrine hemmt. Es wird derzeit in Phase I und II-Studien an Patienten mit Pankreaskarzinom, kleinzelligem Bronchialkarzinom und Glioblastom getestet. In einem Mausmodell für metastasierenden Brustkrebs erwies sich die Therapie mit Cilengitide plus Radioimmuntherapie („RIM“) der alleinigen Radioimmuntherapie als signifikant überlegen [6]. Interessant dabei war, dass die alleinige Therapie mit Cilengitide keinen Einfluss auf das Tumorstadium hatte. In Kombination mit Radioimmuntherapie steigerte sich die Effektivität der Therapie jedoch um ein Vielfaches. Dieser Effekt ließ sich vor allem auf eine verstärkte Apoptoseneigung zurückführen [6]. Dabei war bei den Mäusen keine verstärkte Toxizität nachzuweisen.

Ebenso ist bekannt, dass auch im Myokard Integrine, vor allem  $\beta.1$ ,  $\beta.3$ , und  $\beta.5$  mit jeweils unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten exprimiert werden. Diese Daten lassen vermuten, dass auch im Herzen Integrine an entscheidenden Wachstumsprozessen wie der Myokardhypertrophie beteiligt sind. So wurde z.B. gezeigt, dass die Proliferation von humanen fetalen Kardiomyozyten durch „epidermal growth factor“ (EGF) integrinabhängig war. Insbesondere die beiden Integrinunterformen  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  waren dabei involviert [7]. Dies weist auf ein koordiniertes zeitliches Zusammenspiel zwischen der Extrazellulärmatrix und spezifischen Integrinen während der Entwicklung des Herzens hin [8]. Es ist also weniger die generelle Anwesenheit bestimmter Integrinunterformen, sondern vielmehr die zeitlich abgestimmte Expression dieser während der Organentwicklung entscheidend. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Veränderungen der Kardiomyozyten und Fibroblasten während des kardialen Wachstumsprozesses von einer Freisetzung des  $\beta.1$ -Integrins begleitet wurden. Das  $\beta.1$ -Integrin wurde als Fragment im Interstitium von Zellkulturen beobachtet [9]. Das Ablösen der Integrine von der Zelloberfläche könnte eine ganz neue Art und Weise der Zellinteraktion mit der Extrazellulärmatrix im Wachstumsprozess des Herzens bedeuten. In verschiedenen knock-out-Studien wurde gezeigt, dass Integrine essentiell für die normale Entwicklung aller Organe sind [10-13]. Der knock-out des  $\beta.1$ -Integrins verhinderte die Implantation der Blastozyste und war somit für den Embryo letal [14,15]. Aber nicht nur das Zellwachstum, sondern auch das Überleben der Zellen im Verbund wird durch die Integrin-vermittelte Aktivierung bestimmter EZM-Proteine

getriggert [16]. Gerade das Überleben der Zellen ist ein entscheidender Bestandteil des kardialen Hypertrophieprozesses. Dadurch wird die sogenannte Apoptose verhindert und das Myokard kann hypertrophieren. Dabei spielt die „focal adhesion kinase“ (Fak) möglicherweise eine entscheidende Rolle [17]. Die Grundlage für die Aktivierung von Integrinen ist ein vermehrtes Angebot von Liganden in der Extrazellulärmatrix (z.B. Kollagen, Fibronectin, Vitronectin, Laminin) bzw. im Plasma (z.B. Fibrinogen, Thrombin, Fibronectin).

Alternativ kann jedoch auch die interne Integrinaktivierung zu einer vermehrten Interaktion mit bereits vorhandenen Liganden führen („inside-out-signaling“) [18].

### **1.1.1 Entstehung der Herzhypertrophie**

Die Herzhypertrophie ist ein adaptiver Mechanismus, mit welchem das Herz eine länger dauernde hämodynamische Belastung kompensiert. Physiologischerweise hängt die Herzleistung von vier Einflussgrößen ab:

- Vorlast
- Nachlast
- Kontraktilität
- Herzfrequenz

Die Vorlast stellt das Ausmaß der Muskelfaservordehnung auf Grund des venösen Rückstroms, die Nachlast die Summe des Auswurfwiderstandes dar. Bei physiologischer Belastung unterscheidet man hierbei die folgenden beiden Adaptationsprozesse:

#### **Anpassung bei Volumenbelastung**

Bei gesteigertem metabolischen Bedarf des Körpers erhöht ein vermehrter venöser Rückstrom die enddiastolische Füllung, und der Ventrikel wirft ein größeres Schlagvolumen bei Zunahme des Restvolumens aus, ohne dabei den systolischen Druck wesentlich zu verändern.

#### **Anpassung bei Druckbelastung**

Medikamentös, z.B. durch Gabe von Angiotensin II, kann gezielt die Nachlast erhöht werden. Dabei reduziert sich vorübergehend das Schlagvolumen auf Kosten eines erhöhten Restvolumens. Der venöse Rückstrom bleibt unverändert und bedingt in den folgenden Zyklen eine vermehrte enddiastolische Füllung. Die anschließende Normalisierung des Schlagvolumens erfolgt bei erhöhtem enddiastolischen Füllungsdruck

und angepasster Unterstützungskontraktion. Kommt es jedoch auf Grund verschiedener Umstände zu einer Chronifizierung einer solchen Situation, ist der Herzmuskel auf kurz oder lang gezwungen, sich an die veränderten Bedingungen anzupassen. Hämodynamische Überlastung ist eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung der Herzhypertrophie. Die Ursachen dafür, wie z.B. Bluthochdruck, Myokardinfarkt oder Herzklappendefekte, lösen häufig die Entwicklung einer Herzinsuffizienz aus. Im Frühstadium einer Herzinsuffizienz mit leichter Einschränkung der Herzfunktion werden durch die arterielle Vasokonstriktion der Blutdruck und über die Vermehrung des intravasalen Volumens die Vorlast angehoben. Bei Erreichen der Rekompensation tritt der Rückkopplungsmechanismus der Baroreflexkontrolle in Kraft. Dabei stellt sich ein neues hämodynamisches Gleichgewicht ein. In der chronischen Phase der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz spielen die aktivierten neurohumoralen Faktoren eine deletäre Rolle. Die inhibitorischen Impulse der Barorezeptoren sind vermindert und verlieren dadurch ihre kontrollierende Funktion auf den Sympathikus und das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Als Folgen stellen sich eine kritische Vasokonstriktion und Natrium-/Volumenretention ein. Unter diesen Bedingungen einer inadäquat gesteigerten Vor- und Nachlast dekompenziert das Regulationssystem und führt zu einer weiteren Reduktion des Herzminutenvolumens. Am Anfang dieses äußerst komplexen Prozesses steht, wie bereits einleitend erwähnt, die Hypertrophie des Herzmuskels. Die Mechanismen und Vorgänge, die den Hypertrophierungsprozess bewirken, sind nur unvollständig bekannt. Dies liegt unter anderem an dem komplexen Zusammenspiel verschiedener „Stressfaktoren“, die als Antwort auf die Belastung des Herzens gebildet werden [19,20]. Das sind z.B. neurohumorale Botenstoffe, parakrine/autokrine Botenstoffe und zum anderen auch lokale Veränderungen im Sinne einer Reorganisation des Zytoskeletts, wie sie im Rahmen des Umbaus der „Extrazellulärmatrix“ (EZM) vorkommen [21-23]. Im hypertrophierenden Myokard ist eine Zunahme von Extrazellulärmatrixproteinen wie Kollagen und Fibronectin bekannt [21-23]. Weiterhin ist auch eine Zunahme der kardiozytären Zellsteifheit sowie der Mikrotubuli des Zytoskeletts bei Hypertrophie beschrieben [24,25].

Beide Beobachtungen geben Hinweise auf eine Beteiligung von Integrinen bei der Übersetzung extrazellulärer mechanischer Stimuli in intrazelluläre Signale im Herzen. Die ursprünglich von Wang an Endothelzellen gezeigte wesentliche Funktion der In-

tegrine für die Mechanotransduktion [26] spiegelt somit einige der Veränderungen im hypertrophierenden Myokard wieder und macht eine Rolle der Integrine als Mechanotransduktoren im Herzen wahrscheinlich.

Die erste Beschreibung einer Beteiligung von Integrinen an der kardialen Hypertrophie von Kuppuswamy [27] konnte die Assoziation von  $\alpha.v/\beta.3$ -Integrin, aktiviertem c-Src und „focal adhesion kinase“ (FAK) mit dem Zytoskelett zeigen. Diese Komplexbildung im Zytoskelett findet sich nur im aktivierten Zustand von Integrinen [28] und weist auf deren Beteiligung in der Signaltransduktion während kardialer Hypertrophie hin.

Neben den Vorarbeiten von Laser et al. konnten zwei weitere Gruppen an neonatalen Kardiozyten zeigen, dass Integrinaktivierung zu Hypertrophieentwicklung führt. Dazu hat die Gruppe um Ross mit Hilfe von adenoviralem Gentransfer  $\beta.1$ -Integrin in neonatalen Kardiozyten überexprimiert. Neben der Zunahme der Proteinsynthese wurde auch ANF (atrialer natriuretischer Faktor) als Hypertrophiemarker vermehrt gebildet [19].

Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass die Kultivierung von Kardiozyten auf einer Fibronectinmatrix zu Integrin-vermittelter Hypertrophie führt [19,20]. Zusätzliche wichtige Hinweise für die Funktion der Integrine im Herzen wurden in knock-out Studien erhoben. Bei „partieller“ Ausschaltung des  $\beta.1$ -Integrin-Gens kommt es zu embryonaler Letalität, welche auf schweren kardialen Missbildungen beruht [29]. Auch der knock-out von Integrin-nachgeschalteten Signalproteinen, wie dem Adapterprotein p130 Cas führt zu myokardialer Wandschwäche und embryonaler Letalität [30].

## **1.2 Molekularbiologischer Hintergrund**

Im hypertrophierenden Myokard sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Signalwegen beschrieben worden. Das Ziel dieser Studien war es, den Prozess der Herzhypertrophie und die dabei ablaufenden Signalwege zu untersuchen. Um einen kurzen Überblick zu geben, seien die wichtigsten Signalwege kurz erläutert.

### **Der Calcineurin-NFAT-Signalweg**

Die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin wird in verschiedenen Geweben exprimiert und besteht aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit.

Calcineurin verbindet sich bei erhöhter intrazellulärer Kalziumionenkonzentration mit Calmodulin und wird dadurch aktiviert. Daraufhin dephosphoryliert Calcineurin wichtige Transkriptionsfaktoren, vor allem vom Typ NFAT, welche nun in den Zellkern wandern und bestimmte Gene aktivieren. Die physiologische Bedeutung dieses Enzyms wurde ursprünglich in humanen T-Zellen nachgewiesen, wo es durch die oben beschriebene Reaktionskette zur Aktivierung bestimmter Gene kam, die eine vermehrte Produktion von Interleukin 2 zur Folge hatten [31]. In jüngster Zeit wurde über diesen Signalweg auch bei Kardiomyozyten berichtet. Die Aktivierung von Calcineurin in transgenen Mäusen führte zu massiver Dilatation der Mäuseherzen und konstitutiv zu Herzversagen [32].

### **Der PI3-Kinase/Akt/GSK-3-abhängige Signalweg**

Phosphoinositol 3-Kinasen repräsentieren eine Familie von Enzymen, die sowohl Protein-, wie auch Lipid-Kinase-Aktivität besitzen und mit vielen Signaltransduktionsprozessen verbunden wurden. Sie sind beteiligt an Zellwachstum, -überleben und -proliferation [33]. Eines der wichtigsten Ziele der PI3-Kinase ist die Serin-Threonin-Kinase Akt, die auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet wird. Daran schließen sich eine Vielzahl weiterer nachgeschalteter Überträgermoleküle an. Zwei Wichtige sind GSK-3 und mTor („mammalian target of rapamycin“). Rapamycin ist ein immun-suppressives Medikament und bildet zusammen mit seinem intrazellulären Rezeptor FKBP12 einen Komplex mit mTor. Diese ist eine weit verbreitete Serin-Threonin-Kinase, die in den Mechanismus der Proteintranslation eingebunden ist [34]. Daneben kommt es auch zur Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase GSK-3 $\beta$  durch die Proteinkinase B. GSK-3 $\beta$  phosphoryliert einige Regionen im N-terminalen Bereich verschiedener Proteine vom NFAT-Typ [35]. Dadurch werden diese an der Translokation in den Zellkern gehindert und damit die Transskription gestoppt. Interessanterweise bewirkt die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  durch die Proteinkinase-B die Inaktivierung dieses Enzyms. Dadurch überwiegt die Transskription im Zellkern und trägt so möglicherweise zur Hypertrophieentwicklung des Myokards bei [36].

### **Regulation der Transskription durch MEF2/HDAC**

Viele verschiedene Kalzium-abhängige Signalmoleküle, wie z.B. Calcineurin und MAP-Kinasen, sind an der Signaltransduktion der kardialen Hypertrophie beteiligt. Es scheint daher möglich, dass es eine gemeinsame Endstrecke dieser Signalwege gibt.

Ein wichtiger Kandidat hierfür scheint der Transskriptionsfaktor MEF2 zu sein [37]. Die Aktivität dieses Transskriptionsfaktors wird direkt durch die Assoziation mit Histon-Deazetylasen (HDACs) kontrolliert. Diese deazetylieren nukleosomale Histonproteine und bewirken dadurch eine Verringerung der Transskription im Zellkern. Kürzlich wurde darüber berichtet, dass hypertrophe Stimuli, wie z.B. Drucküberlastung, bestimmte Kinasen aktivieren, die die Assoziation von HDACs mit MEF2 regulieren [38]. Insgesamt ist es also durchaus denkbar, dass diese Interaktion eine Reihe von Signaltransduktionsprozessen reguliert und damit entscheidenden Einfluss auf die kardiale Hypertrophie nimmt.

### **G-Protein-vermittelte Signalwege**

Viele verschiedene para- und autokrine Botenstoffe sind an G-Proteine gekoppelt. Auch im hypertrophierenden Myokard spielen diese Signalwege eine wichtige Rolle [39]. So vermitteln z.B. Angiotensin II, Endothelin I und die alpha-adrenergen Rezeptoren ihre Wirkung über  $G_q$ -Proteine, welche ihrerseits wiederum an die Phospholipase C gekoppelt sind [40]. Dagegen sind die beta.1-adrenergen Rezeptoren an  $G_s$ -Proteine gebunden, welche ihrerseits die Adenylatzyklase aktivieren. Daraus resultiert die positiv inotrope, chronotrope und lusitrope Wirkung der beta.1-adrenergen Substanzen. Die Adenylatzyklase aktiviert die Proteinkinase-A (PKA) und hat somit Einfluss auf viele verschiedene nachgeschaltete Signalwege. Die muskarinergen wie auch die beta.2-adrenergen Rezeptoren sind an  $G_i$ -Proteine gekoppelt. Diese inhibieren die Adenylatzyklase und die  $G_s$ -Protein-vermittelten Signalwege. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Reduktion der  $\beta$ -Rezeptoren wie auch zu einer Inaktivierung deren Funktion [41]. Letzteres wird durch  $\beta$ -Adrenozeptor-Kinasen ( $\beta$ -ARK) vermittelt, welche den Rezeptor phosphorylieren und damit dessen Sensitivität gegenüber Agonisten vermindern. Durch einen Hemmer dieser Kinasen war es in einer Studie möglich, eine Kardiomyopathie zu lindern [42]. Ein ähnliches Ziel verfolgt man mit einer  $\beta$ -Blocker-Therapie, welche seit vielen Jahren bei Herzerkrankungen eingesetzt wird.

### **Kleine GTP-bindende Proteine**

Kleine G-Proteine stellen eine Verbindung zwischen der Zellmembran und verschiedenen intrazellulären Signalwegen dar. Die Familie der kleinen G-Proteine besteht aus mehreren Mitgliedern, die verschiedene Prozesse steuern, z.B. Zellwachstum, Zellteilung, Organisation des Zytoskeletts und die zelluläre Motilität. Diese kleinen G-

Proteine werden durch GTP aktiviert, hydrolysieren dieses zu GDP und kehren damit in ihren inaktiven Zustand zurück. Eines dieser kleinen G-Proteine, „ras“, wurde im hypertrophierenden Myokard transgener Mäuse beobachtet und führte in diesem Modell zu einem signifikanten Anstieg der Herzmasse [43]. Dieses G-Protein ist wiederum an viele andere Signalmoleküle wie raf, PI3K, Ral-GDS/rac und MAP-Kinasen gekoppelt.

### **MAP-Kinase-Signalweg**

MAP-Kinase-Signalwege stellen durch Phosphorylierung und Regulation vieler Transkriptionsfaktoren eine wichtige Verknüpfung zwischen externen Stimuli und dem Zellkern dar. Dabei unterscheidet man drei Subfamilien dieser Kinasen: ERKs, JNKs und p38 MAP-Kinasen. Die beiden letzten Gruppen werden auch als „Stress-responsive“ Kinasen bezeichnet, da sie nicht nur durch anabole Stimuli und Agonisten, sondern auch durch „Stresszustände“ wie z.B. Ischämie und Azidose aktiviert werden können [44]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese beiden Gruppen von Kinasen in den Hypertrophieprozess des Herzens involviert sind. Die Rolle der ERKs im hypertrophierenden Myokard wird heute kontrovers diskutiert. Möglicherweise scheinen diese eine entscheidende Rolle im physiologischen Wachstums des Myokards, z.B. bei Sportlern zu spielen [45].

### **Protein-Kinase-C-vermittelte Signalwege**

Protein-Kinase-C (PKC) ist eine in allen Geweben exprimierte Serin-Threonin-Kinase, die vorwiegend durch G<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. In vielen Studien wurde bereits die Beteiligung dieser Proteinkinase an der Herzhypertrophie gezeigt [45,46]. Darüber hinaus führte die transgene Überexpression der PKC in Rattenherzen zu kardialer Hypertrophie und plötzlichem Herztod [47].

### **Gp130/STAT3-Signalwege**

Gp130 ist ein Rezeptor für verschiedene Zytokine, z.B. Interleukin 6 und 11 sowie Kardiotrophin-1 (CT-1). Letzteres induziert Hypertrophie bei Kardiomyozyten (in vitro) [48]. Gp130 aktiviert sowohl MAP-Kinasen wie auch JAK/STAT-Signalwege [49]. Dies alles sind Signalwege, die eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Folge haben und somit regulierend auf die Genexpression wirken. Insbesondere STAT3 wandert nach Aktivierung durch Gp130 in den Zellkern und aktiviert dort Gene, die am Hypertrophieprozess beteiligt sind [50]. Die Überexpression von

STAT3 in transgenen Mäusen bewirkt eine Hypertrophie von Kardiomyozyten in vitro [51] und in vivo [52]. Darüber hinaus zeigte sich in dominant-negativen Mausmutanten bezüglich Gp130 eine verminderte kardiale Hypertrophie nach Aortenkonstriktion im Vergleich zu Wildtypmäusen [53].

### MMP und TNF-Beteiligung

Matrixmetalloproteinasen sind Enzyme, die den Metabolismus der Extrazellulärmatrix regeln. Sie werden nach einem Infarkt hochreguliert und sind möglicherweise an der Entstehung der Herzinsuffizienz beteiligt [54]. Mehrere Studien haben belegt, dass die pharmakologische Hemmung der MMPs einen positiven Effekt nach experimenteller Infarzierung des Myokards haben [55-57]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Hemmung der Matrixmetalloproteinase 12 (ADAM12) sowohl die Entstehung der Hypertrophie als auch eine Dilatation des Herzens nach Drucküberlastung verhinderte [58].

Eine Übersicht über die verschiedenen Signalwege im hypertrophierenden Myokard gibt folgende Abbildung:

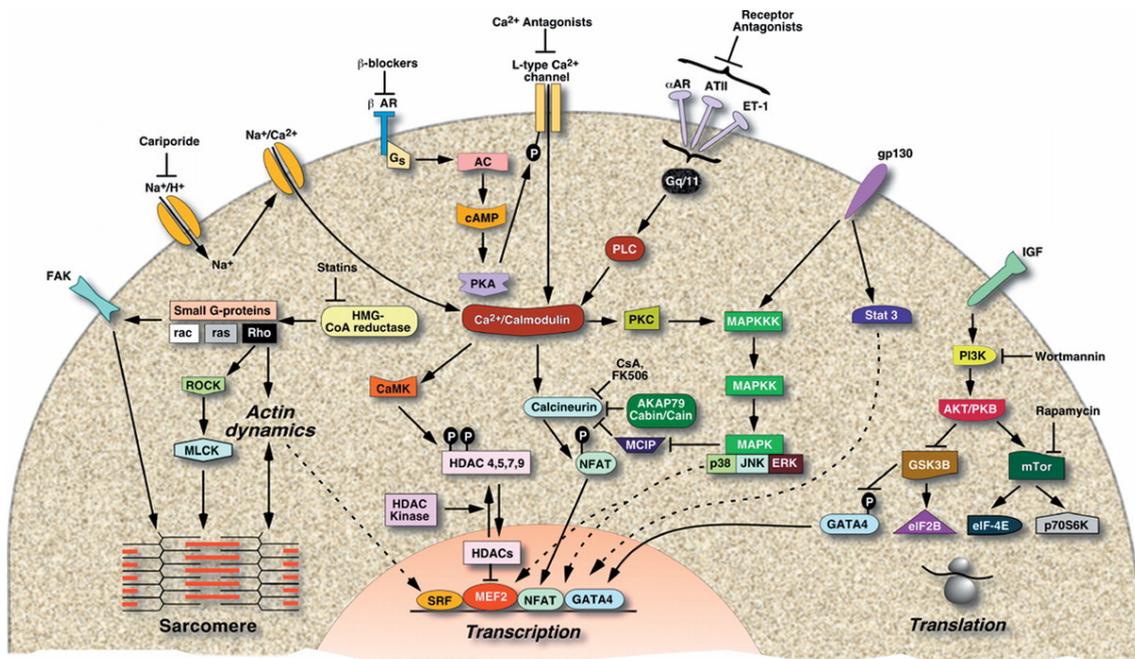


Abb. 1  
Diese Abbildung gibt eine Übersicht über verschiedene Signalwege, die am Hypertrophieprozess des Herzens beteiligt sind (aus „Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly“, [45]).

### **Integrin-vermittelte Signalwege**

Nach Druck- oder Volumenbelastung kommt es innerhalb von 48 Stunden zur Induktion von sogenannten „immediately early genes“ (IEG). Deren Produkte sind verschiedene Extrazellulärmatrixproteine wie z.B. Fibronectin und Vitronectin. Diese nehmen über ihr RGD-Motiv Kontakt zu Integrinen auf und führen so zur Aktivierung von Fak (focal adhesion kinase) und c-Src. Hierdurch kommt es zur Entstehung des sogenannten „fokalen Adhäsionskomplexes“, welcher am Umbau des hypertrophierenden Myokards beteiligt ist.

Eine Herzhypertrophie muss nicht in jeder Situation schädlich für den Organismus sein. Beispielsweise ist sie bei Athleten eine wichtige Voraussetzung für den gesteigerten Trainingszustand des Körpers. Es ist allerdings bis heute nicht bekannt, bis zu welchem Zeitpunkt eine pathologische Herzhypertrophie, z.B. nach Herzinfarkt, zur Kompensation beiträgt, und ab wann sie für den Organismus schädlich wird. Es wäre daher nicht verwunderlich, wenn es unterschiedliche Signalwege für die physiologische und pathologische Herzhypertrophie gäbe. In der Tat hat sich in den letzten Jahren sowohl auf morphologischer wie auch auf molekularer Ebene ein differentes Bild zwischen diesen beiden Vorgängen ergeben. Im Gegensatz zur pathologischen kommt es bei der physiologischen Hypertrophie nicht zu einer Vermehrung des Kollagens im Myokard [59]. Dagegen gibt es aber Signalwege, die bei beiden Hypertrophieformen eine Rolle spielen. Dies wurde für den Calcineurin-Weg nachgewiesen [60,61].

### **1.3 Aufbau und Funktion der Integrine**

Integrine sind transmembranöse Proteine, die eine feste Anheftung von Zellen an EZM-Proteine bewirken. Dabei stellen sie eine Verbindung der EZM-Proteine zu dem intrazellulären Aktinzytoskelett her. Integrine sind ubiquitäre, heterodimere Membranrezeptoren aus jeweils einer alpha- und einer beta-Untereinheit. Es gibt insgesamt fast 30 verschiedene Untereinheiten. Durch die Kombination dieser verschiedenen Untereinheiten untereinander werden heterodimere Membranproteine gebildet, die hochspezifische Funktionen erfüllen. Die ursprüngliche Meinung, dass Integrine nur eine mechanische Verbindung zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett herstellen, musste längst erweitert werden. Mittlerweile wurden hochspezifische Funktionen für zahlreiche der Integrinkombinationen gefunden. Dies reicht von der Regulation von Zell-

zyklus und Apoptose, Tumorwachstum [62], Zellmigration, Regulation von Ionenkanälen [63], bis zum „inside-out signaling“ [18,64] mit Modellierung von Extrazellulärmatrixproteinen sowie der Interaktion mit Matrixmetalloproteinasen [65,66].

Integrine sind also nicht nur an der Übersetzung von Signalen von der Extrazellulärmatrix ins Zellinnere („outside-in signaling“), sondern ebenso an Rückkopplungsprozessen des Zellinneren an die Extrazellulärmatrix beteiligt („inside-out signaling“) [67]. Im Wesentlichen sind alle Funktionen an der Steuerung von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt.

Zur Veranschaulichung der wesentlichen Integrinfunktionen und-interaktionen im Zellverbund dient Abb.2:

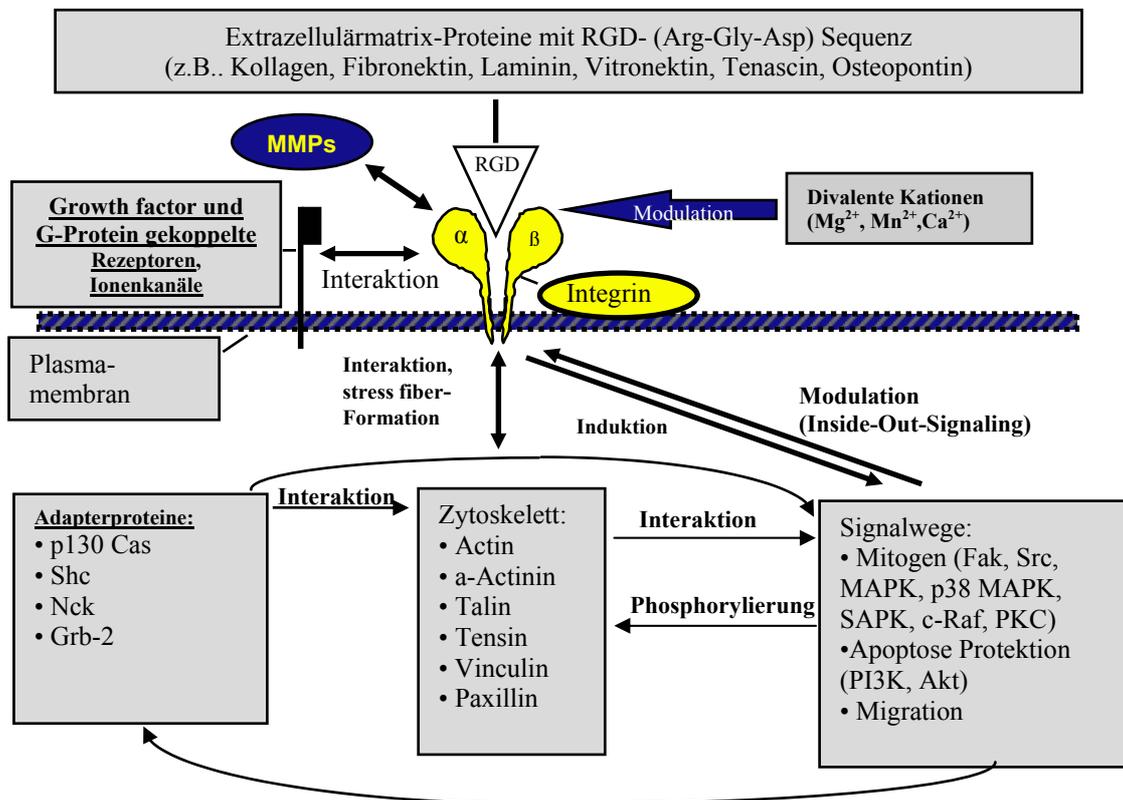


Abb.2

In dieser Abbildung sind die wesentlichen Funktionen und Interaktionen der Integrine im Zellverbund dargestellt. Integrine sind heterodimere Proteine, die in die Zellmembran eingelagert sind. Der Kontakt zur EZM wird über ein RGD-Motiv hergestellt. Sie regulieren weiterhin MMPs und beteiligen sich somit am Umbau der EZM. Des Weiteren interagieren sie mit verschiedenen Rezeptoren und Ionenkanälen. Über mehrere Adaptermoleküle tragen sie zum Umbau des Zytoskeletts bei und greifen in viele Signaltransduktionswege ein.

Zelluläre Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix sind sehr wichtig für die Entwicklung der Herzens [7,68-70]. Diesbezüglich konnte man zeigen, dass die Proliferation humaner fetaler Kardiomyozyten entscheidend von der Adhäsion an beta.1-Integrine abhängt. Dies waren insbesondere  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  [7]. Die zeitliche Expression verschiedener Integrinunterformen während der Entwicklung des Herzens lieferte dabei Hinweise auf die Koordination zwischen bestimmten Integrinen und deren Substraten in der Extrazellulärmatrix [8,9].  $\beta_1$ -Integrin-knock-out-Versuche zeigten, dass diese Ablation kurz nach der Implantation der Blastozyste letal für den Embryo war [14,15]. Weiterhin fand man heraus, dass in quergestreifter Muskulatur  $\beta_{1D}$ -Integrin, eine spezielle Isoform des  $\beta_1$ -Integrins, exprimiert wurde.

In einigen Experimenten wurde das im ganzen Körper vorkommende  $\beta_{1A}$ -Integrin durch spezifisches  $\beta_{1D}$ -Integrin ersetzt. Auch das war für den Embryo letal. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Reduzierung der beta.1-Integrinexpression in Kardiomyozyten zu einer progressiven Einschränkung der Herzfunktion und schließlich zu Herzinsuffizienz führte [71]. Bei der Entwicklung verschiedener Herzkrankheiten wie der dilatativen Kardiomyopathie und dem Myokardinfarkt wurden bereits deutliche Veränderungen am Gehalt und der Zusammensetzung verschiedener Extrazellulärmatrixproteine beschrieben. Besonders deutlich wurde dies bei der Expression von Kollagen, Fibronectin, Osteopontin und Tenascin [21,22,72-75]. Als wesentliche Grundlage zu unserer Arbeit wurde bereits der deutliche Anstieg des beta.5-Integrins und dessen Übertritt in die zytoskelettäre Fraktion im Katzenmodell des rechten Ventrikels nach Pulmonalarterienkonstriktion beschrieben [27]. Dies weist auf die Beteiligung dieser Integrinunterform am Hypertrophierungsprozess des Herzens hin. Dennoch ist es bisher nicht gelungen, die einzelnen Expressionsmuster der verschiedenen Integrine und deren Interaktion mit der Extrazellulärmatrix im Hypertrophierungsprozess des Herzens genauer zu untersuchen. Dazu benutzten wir ein Tiermodell, welches uns erlauben sollte, die einzelnen Schritte, die bereits am rechten Ventrikel der Katze gezeigt wurden, auf den linken Ventrikel der Mäuseherzen zu übertragen.

## **1.4 Herzhypertrophie im Tiermodell**

### **1.4.1 Tiermodelle im Allgemeinen**

Die wohl wichtigsten Tiermodelle stellen die Modelle humaner Krankheiten dar. An ihnen lassen sich molekulare und biochemische Grundlagen von Krankheiten erfassen und neue Therapieformen entwickeln. Als Modelle kommen verschiedene Organismen in Frage. Primaten sind zwar dem Menschen am Nächsten verwandt und in entwicklungsbiologischer, biochemischer und anatomischer Hinsicht ähnlich, jedoch haben sie lange Generationszeiten und eine hohe Lebenserwartung, weshalb sich Krankheitsverläufe nur über sehr lange Zeiträume beobachten ließen. Neben den hohen Kosten bei ihrer Züchtung besteht zudem keine gesellschaftliche Akzeptanz gegenüber Primaten als Tiermodellen, so dass man kleinere Labortiere, wie Nagetiere nutzt. Mäuse bieten viele Vorteile. Sie ähneln in biologischer und genetischer Hinsicht dem Menschen, so dass viele an der Maus gewonnene Erkenntnisse auch für den Organismus des Menschen gelten. Das Genom der Maus gleicht dem des Menschen hinsichtlich der Größe und der Anzahl der Gene. Mittlerweile liegt auch eine Arbeitsversion des Mausgenoms vor. Mäuse haben eine hohe Reproduktionsrate, eine geringe Lebenserwartung und werden sehr schnell geschlechtsreif. Daher kann man die Effekte von veränderten Genen über viele Generationen gut beobachten. Mäuse sind deshalb die wichtigsten Tiermodelle für menschliche Erkrankungen. Schon seit Jahren wird das Mausgenom analysiert und viele Mutationen, die zum Teil spontan in einer Population auftraten oder durch äußere Einwirkungen (z.B. chemische Mutagenese) erzeugt wurden, sind bereits kartiert. Mittlerweile existieren internationale Projektkooperationen, die auf das Beschreiben der Funktion jeden einzelnen Gens der Maus mit unterschiedlichen Strategien abzielen. Viele Modelle für humane Erkrankungen wurden bereits in Mäusen etabliert. Dazu gehören Erkrankungen wie die Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus), Degeneration der quergestreiften Muskulatur (Muskeldystrophie) und verschiedene maligne Erkrankungen. Für einige Krankheiten, z.B. Bluthochdruck, eignet sich die Maus jedoch nicht als Modell. Dort greift man auf Ratten zurück. Die Generationszeit ist bei Ratten länger als bei Mäusen, jedoch sind sie teilweise für physiologische, pharmakologische und Verhaltensbeobachtungen besser zugänglich.

## **1.4.2 Tiermodelle in der klinischen Forschung**

In klinischen Studien werden unterschiedliche Tierarten verwendet, um anhand eines Tiermodells Erkenntnisse über menschliche Erkrankungen zu erlangen. Dabei richtet sich die Wahl der Tierart meistens nach dem Studienaufbau und der Dauer der Experimente. Die Kosten für diese Experimente spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. So wurde zur Unterscheidung des Einflusses zwischen normothermer und hypothermer Herz-Bypass-Operation auf die systemische Mikrozirkulation ein Schweinmodell verwendet, welches es erlaubte, Aussagen über proinflammatorische und ischämische Prozesse der Mikrozirkulation bei Operationen zu machen [77]. Dabei waren diese bei normothermer Operation deutlich erhöht. Dies wies auf die protektive Wirkung der Hypothermie bei solchen Operationen hin. Zur Untersuchung der chronischen rechtsventrikulären Hypertrophie wurde ein Hundemodell entwickelt [78]. Zusammen mit einer speziellen Computersoftware soll dieses Modell weitere Studien mit speziellen Fragestellungen ermöglichen.

Wir verwendeten zur Untersuchung der mechanisch induzierten Signalwege am hypertrophierenden Myokard ein Mausmodell. Die Gruppe um Laser et al. benutzte ein Katzenmodell [79]. Durch Pulmonalarterienkonstriktion wurde eine rechtsventrikuläre Drucküberlastung erzeugt [79]. Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war es, die Signalwege der rechtsventrikulären Drucküberlastung am Katzenmodell auf das Modell des linken Ventrikels adulter Mäuse zu übertragen und nachzuweisen. Dazu wurden ausgewachsene Mäuse einer Konstriktion der transversalen Aorta unterzogen. Diese Einengung der Aorta führte bei der Maus im Verlauf von drei bis einhundert Tagen zu einer ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie mit deutlicher Zunahme des Herzgewichtes in Relation zum Körpergewicht. Zu den Zeitpunkten 3, 7, 30 und 100 Tagen wurden Messungen an den Mäusen durchgeführt. Als Kontrolle dienten jeweils scheinoperierte (sham) Tiere.

## **1.5 Herstellung von knock-out-Mauslinien**

Um sich mit der Funktion und Regulation eines Proteins im Herzen genauer zu beschäftigen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Genexpression. Dabei kann man die DNA einer Maus so verändern, dass ein ganz bestimmtes Protein entweder

überexprimiert oder es aber ausgeschaltet wird („knock-out“). In unserem Fall benutzen wir eine spezielle Strategie, um ein bestimmtes Gen im Herzen der Mäuse auszuschalten. Da sich derartige Erbgutveränderungen häufig letal auswirken [29], muss man versuchen, bestimmte Genabschnitte gewebespezifisch auszuschalten. Wie schon erwähnt, wäre ein generelles Ausschalten dieses Gens in allen Geweben für die Maus letal. Um dies zu vermeiden, benutzten wir Mäuse, die die Rekombinase „Cre“ exprimierten.

Dieses Enzym wurde erstmals von Sauer et al. 1993 beschrieben. Es kann benutzt werden, um Punktmutationen hervorzurufen oder um gewebespezifisch Gene auszuschalten. Das erste Mal wurde diese Idee von Gu und Rajewsky umgesetzt. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase eliminierten sie das Gen für die DNA-Polymerase  $\beta$  in T-Zellen [80]. Die Cre-Rekombinase gehört zu der Untergruppierung der  $\lambda$ -Integrasen, die an ihren Zielstellen, den „lox-P“-Sequenzen, effizient Rekombinationen bewirken.

Die Rekombinase Cre gewährleistet somit das selektive Herausschneiden eines Genabschnittes, welcher von zwei „lox-P“-Sequenzen flankiert wird. Dabei handelt es sich aber immer noch um ein gewebeunspezifisches Ausschalten eines Genabschnittes. Indem man die Cre-Expression der Regulation eines herzspezifischen Promotors (MLC2v) unterstellt, erreicht man ein „herzspezifisches“ Ausschalten eines bestimmten Genabschnittes [81]. Das MLC2v-Gen ist der früheste herzspezifische Marker in der Entwicklung eines Säugetierherzens [82].

Die Gruppe um Chien et al. benutzte dieses Cre/lox-P-System erstmals 1998 um einen herzspezifischen knock-out für das „RXR $\alpha$ “-Gen („retinoic acid receptor gene“) in Mäusen zu schaffen. RXR $\alpha$  ist ein nukleärer Rezeptor, welcher in den Vitamin A-Signalweg eingeschaltet ist [83]. Insgesamt gibt es sechs verschiedene Rezeptortypen, die an diesem Signalweg teilhaben. Deren gemeinsamer Agonist ist Retinsäure, ein Vitamin-A-Metabolit. Mäuse mit einem kompletten knock-out des RXR $\alpha$ -Gens starben an den Folgen der gestörten Entwicklung der Herzkammern und konsekutivem Herzversagen [84]. Im Gegensatz dazu zeigten die konditionalen knock-out-Mäuse, bei denen das RXR $\alpha$ -Gen zu ca. 80% ausgeschaltet war, einen völlig normalen kardialen Phänotyp [81]. Daraus schloss die Gruppe um Chien et al., dass dieses Gen für die Entwicklung der Kardiomyozyten nicht benötigt wird. Da es jedoch in fast allen anderen Geweben vorhanden ist, musste ein anderer Defekt in den kompletten knock-out-

Mäusen vorhanden sein, der zu dem schweren, letal endenden Phänotyp führte. Kurz vorher hatte die Gruppe um Chien et al. gezeigt, dass der herzspezifische Promotor MLC 2v (Myosin light chain 2v) essentiell für die Entwicklung der Mäuseherzen ist. Die Ausschaltung dieses Promotors endete letal für den Mausembryo. Diese Ausschaltung konnte auch nicht durch eine andere Isoform MLC 2a des Promotors ersetzt werden.

In allen Geweben, in denen der herzspezifische Promotor MLC2v nicht vorhanden ist, kann also auch die Cre-Rekombinase nicht exprimiert werden. Dadurch wird das Ausschalten des betreffenden Gens in diesen Geweben verhindert.

Kürzlich erst konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ 1-Integrin-knock-out-Mäuse, die mit Hilfe des Cre/loxP-Systems gezüchtet wurden, eine deutliche Fibrose im Herzen entwickelten. Außerdem zeigten diese Mäuse nach sechs Monaten erste Anzeichen einer dilatativen Kardiomyopathie [71].

Um den Einfluss des beta.1-Integrins auf die Entwicklung der Herzhypertrophie zu untersuchen, benutzten wir dieses Cre/loxP-System um eine möglichst komplette Ausschaltung des beta.1-Integrins im Herzen der Mäuse zu erreichen. Dabei konnte ebenfalls eine ca. 80%-ige Ausschaltung des beta.1-Integrins erreicht werden. Der komplette knock-out bezüglich des beta.1-Integrins wäre für die Maus letal gewesen.

## **1.6 Integrin alpha.v/beta.5-Inhibition**

Da ein selektiver knock-out für das beta.5-Integrin nicht zu Verfügung stand, verwendeten wir einen alpha.v/beta.5-Integrin-Inhibitor, welcher von der Fa. Roche, Basel, zur Verfügung gestellt wurde. Dieser sollte im Tiermodell als Alternative zum genetischen knock-out eingesetzt werden, um damit den Einfluss des beta.5-Integrins auf die Entwicklung der Herzhypertrophie zu untersuchen.

Dazu wurden osmotische Minipumpen, die den Inhibitor in 0,9%-er Kochsalzlösung enthielten, bei Mäusen subkutan implantiert. Die Minipumpen der Firma Alzet wurden bisher für viele verschiedene Substanzen verwendet. Dabei stehen Medikamente an erster Stelle, aber auch Proteine und Hormone können über die Pumpen infundiert werden. Es gibt eine Vielfalt an Applikationsmöglichkeiten bei Mäusen. So kann der Inhalt der Pumpen z.B. subkutan, intraperitoneal, intraarteriell oder sogar intrathekal

infundiert werden. Die Freisetzung des Inhalts kann weiterhin kontinuierlich oder pulsatil erfolgen.

In einer Studie mit transgenen Mäusen, die die Ornithindekarboxylase überexprimierten, wurden die Alzet-Pumpen verwendet, um den Mäusen Isoproterenol, ein beta-adrenergen Agonist, und Atenolol, ein Betablocker, kontinuierlich zu infundieren [85]. Die Ornithindekarboxylase ist ein Enzym, welches gewöhnlicherweise im hypertrophierenden Myokard hochreguliert wird. Es wurde dabei die Entwicklung einer Herzhypertrophie bei den Mäusen unter Infusion von Isoproterenol mit denen unter zusätzlicher Gabe von Atenolol verglichen.

In einer weiteren Studie mit dem ACE-Hemmer Captopril wurde dessen Abschwächung der Hypertrophieentwicklung vor Behandlung mit Norepinephrin bei Ratten untersucht [86]. Beide Substanzen wurden über subkutan implantierte Minipumpen infundiert. Dabei linderte Captopril den diastolischen Blutdruck signifikant. Unter der gemeinsamen Gabe mit Norepinephrin senkte es den systolischen Blutdruck signifikant, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Herzfrequenz.

Eine neuere Studie zeigte den positiven Effekt des Angiotensin I-Rezeptor (AT-1) - Antagonisten auf die Entwicklung von kardialer Fibrose in hypertensiven, transgenen Ratten [87]. Der AT-1-Rezeptor-Antagonist Eprosartan wurde dabei in einer antihypertensiv wirksamen und in einer geringeren, nicht-antihypertensiv wirksamen Dosis über Minipumpen subkutan infundiert. Der systolische Blutdruck, das linksventrikuläre Gewicht und der linksventrikuläre enddiastolische Blutdruck waren bei den hypertensiven Ratten erhöht. Außerdem kam es zu einer verstärkten kardialen Fibrose. Bei den Tieren, die eine antihypertensiv wirksame Dosis an Eprosartan bekamen, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Fibrose.

Wir verwendeten die osmotischen Minipumpen, um den synthetischen alpha.v/beta.5-Integrin-Inhibitor dauerhaft subkutan applizieren zu können. Um die richtige Serumdosis für die Mäuse zu finden, wurde diese vorher mittels etabliertem Bioassay bestimmt. Die Wirksamkeit des Inhibitors im Blut wurde durch einen Inhibitionsassay nachgewiesen.

## 1.7 Fragestellung

Es soll die funktionelle Bedeutung der Integrine bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie untersucht werden. Als Modell ist die Hypertrophieinduktion an Mäuseherzen durch Aortenkonstriktion vorgesehen.

Durch die Vorarbeiten von Laser et al. waren die Signaltransduktionsvorgänge bereits am Katzenmodell des rechten Ventrikels beschrieben worden. Die wesentliche Aufgabe bestand nun darin, die gezeigten Signaltransduktionsprozesse auf das Mausmodell am linken Ventrikel zu übertragen und nachzuweisen.

Um den Einfluss des  $\beta$ 1-Integrins auf die Entwicklung der Herzhypertrophie untersuchen zu können, züchteten wir eine  $\beta$ 1-Integrin-knock-out Mauslinie. Für die Untersuchung des  $\alpha$ .v / $\beta$ 5-Integrins sollte ein synthetischer Inhibitor eingesetzt werden.

Zur Charakterisierung des fokalen Adhäsionskomplexes wurden zunächst die Integrine  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 zusammen mit den intrazellulären Proteinen Fak und c-Src dargestellt. Auf Proteinebene sollten mittels Western Blot Analysen Antikörper gegen die oben genannten Proteine zusammen mit phosphospezifischen Antikörpern in zytoplasmatischen und zytoskelettären Fraktionen eingesetzt werden. Damit lassen sich Proteintranslokationen, Phosphorylierungen, sowie Enzym-Aktivierungen im hypertrophierenden Myokard darstellen.

Diese Untersuchungen sollten es ermöglichen, die bislang unbekannte Bedeutung der Hemmung, bzw. des knock-outs der Integrine  $\alpha$ .v/ $\beta$ 5 und  $\beta$ 1 im Herzen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu erfassen.

## **2 Methodik**

### **2.1 Mausmodell Aortenkonstriktion**

Die Einengung der Aorta im Bereich des Aortenbogens (Aorta transversalis) führt bei der Maus im Verlauf von 48h bis 30 Tagen zu einer ausgeprägten linksventrikulären Hypertrophie mit Zunahme des Herzgewichts in Relation zum Körpergewicht von ca. 40-60%. Zu den Zeitpunkten 3 Tage, 7 Tage, 30 Tage und 100 Tage nach Aortenkonstriktion wurden Messungen an normalen Tieren (Gruppe 1) durchgeführt. Als Kontrolle dienten in den jeweiligen Gruppen scheinoperierte (sham) Tiere. Wir untersuchten 15 Tiere pro Untersuchungszeitpunkt, um statistisch verwertbare Daten zu erheben, was eine Gesamtzahl von 300 Mäusen ergab. Alle Tiere wurden erst im Alter von ca. 12 Wochen in die Studie eingeschlossen, um endogene Wachstumseffekte möglichst gering zu halten.

#### **2.1.1 Hämodynamische und morphologische Untersuchungen**

Zu den jeweils vorgegebenen Untersuchungsendpunkten innerhalb der einzelnen Gruppen wurden vor der Organentnahme in vivo hämodynamische Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse mit Äther anästhesiert, intubiert und kontrolliert mit Isofluran beatmet. Anschließend wurden Millar Katheter (1,4 F) von der rechten Arteria carotis in den linken Ventrikel vorgeschoben und die Druckmessungen durchgeführt [88]. Durch Differenzierung der linksventrikulären Druckkurven (1. Ableitung) konnte der maximale Anstieg des systolischen Druckes ( $+dP/dt_{max}$ ) als Maß für die Kontraktilität sowie der maximale Abfall des diastolischen Druckes ( $-dP/dt_{max}$ ) als Parameter für die Relaxation des Myokards berechnet werden. Nachdem der linksventrikuläre Druck gemessen war, wurde der Katheter in die Aorta zurückgezogen und Blutdruck sowie die Herzfrequenz gemessen. Der linksventrikuläre systolische und enddiastolische sowie der mittlere arterielle Druck und die Herzfrequenz wurden unter leichter Äther-Anästhesie und spontaner Atmung gemessen. Eine Erhöhung des enddiastolischen Drucks konnte dabei quantitative Hinweise auf die Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion geben.

Die Messung des Druckgradienten im Bereich der transversalen Aortenstenose erfolgte durch zusätzliche Katheterisierung der linken A. carotis mit Messung des Blutdrucks (maximaler systolischer Druck) proximal und distal der Aortenkonstriktion in der Aorta ascendens bzw. descendens. Die Differenz aus beiden Druckwerten ergab den Gradienten zur Beurteilung der Effizienz der Aortenkonstriktion und Abschätzung der linksventrikulären Druckbelastung. Danach wurde das schlagende heparinisierte Herz in tiefer Äthernarkose entnommen, in eiskaltem Phosphatpuffer von Blut befreit und nach Entfernung der Vorhöfe gewogen.

Zur Hypertrophiebestimmung wurde das Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht, bzw. auf die Tibialänge, gemessen.

Danach wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff zur weiteren biochemischen und molekularbiologischen Aufarbeitung eingefroren oder für Standardfärbungen (Hämatoxylin-Eosin-Trichrom) in Formalin fixiert.

### **2.1.2 Gewebepräparation**

Zunächst berechneten wir die entsprechende Menge an Puffer pro Herz entsprechend dem Herzgewicht und die benötigte Gesamtmenge an Puffer. Dabei wurden pro 100mg Gewebe ca. 2ml Triton-X-Puffer (2%) veranschlagt. Anschließend gaben wir die Protease- und Phosphataseinhibitoren zum Puffer:

Leupeptin (Sigma L9783), ein reversibler Trypsin- und Zystein-Protease-Inhibitor, Aprotinin (Roche), ein Serinproteasen-Inhibitor, Pepstatin A (Sigma P5318), ein Aspartatprotease-Inhibitor, p-aminobenzamidine (Sigma A7148), ein Serinprotease-Inhibitor, E-64 (Roche), ein Papain- und Zystein-Protease-Inhibitor, EDTA (Sigma), ein unselektiver Metalloprotease-Inhibitor, EGTA (Sigma), ein Metalloprotease-Inhibitor, Natriumvanadat (Sigma S6508), ein Tyrosinphosphatase-Inhibitor. Im Anschluss daran wurden die Röhrchen für die Proben vorbereitet und auf Eis gelagert. Zuletzt konnten schließlich die beiden Inhibitoren, Ocadaic Acid (Calbiochem), ein Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor, und PMSF (Sigma P7626), ein irreversibler Serinprotease-Inhibitor zugegeben werden.

Nun gaben wir das Herz mit der entsprechenden Menge an Puffer in einen „Dounce“-Glaskolben und homogenisierten es, bis keine Gewebestücke mehr zu sehen waren. Das homogenisierte Herz ließen wir zwanzig Minuten auf Eis inkubieren.

Anschließend wurde das Homogenisat mit einer Plastikpipette in 2ml Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 4°C zehn Minuten bei 14000g zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde entfernt und in ein neues Röhrchen transferiert, welches bereits mit der gleichen Menge an 2× SDS-Sample-Puffer gefüllt war. Dieses Röhrchen wurde nach dem Mischen auf Eis gelagert.

Das übrig gebliebene Pellet wurde mit ca. 1ml Triton-Puffer gewaschen, indem es mit einer 1ml Insulinspritze mobilisiert, zerkleinert und mehrmals in die Spritze aufgesaugt wurde. Anschließend wurde erneut bei 4°C und 14000g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder entfernt und das jetzt saubere Pellet in 1× SDS-Sample-Puffer aufgelöst und wie oben beschrieben zerkleinert. Um die letzten feinen Gewebebrocken zu beseitigen, wurde das Pellet mit dem Ultrasonicator zerkleinert. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen (S1, P1) bei 95°C für 5 Minuten gekocht und nun nach Abkühlen entweder direkt auf ein Gel geladen oder bei -80°C aufbewahrt.

## **2.2 Western Blot**

Zunächst wurde das Trenngel vorbereitet und die Glasplatten mit Ethanol gereinigt.

Dabei verwendeten wir bevorzugt 7,5%-ige Gele. Für zwei Gele benutzten wir jeweils 16ml destilliertes Wasser, 11,3ml 1,5M TRIS-Puffer, 280µl 20% SDS-Lösung, 10,5ml 40% Acrylamid-Mix, 4,1ml 2% BIS-Lösung, 14µl TEMED und 315µl 10% APS. Für das Sammelgel benutzten wir:

9ml destilliertes Wasser, 1,75ml 0,5M TRIS, 90µl 20% SDS-Lösung, 1,8ml 40% Acrylamid-Mix, 1,05ml 2% BIS-Lösung, 14µl TEMED und 210µl 10% APS.

Es wurden 20µl der Proben, gelöst in SDS-sample-Puffer, jeweils in eine Tasche des SDS-Page-Gels geladen und über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden am nächsten Tag auf Immobilon-P-Membranen transferiert und anschließend eine Stunde in 10%-iger Milch in TBST geblockt (10mM Tris, 0,1M NaCl, 0,1%

Tween 20, pH 7,4). Die Blots ließ man dann über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubieren, welcher in TBST gelöst war.

Folgende Antikörper wurden benutzt:

Monoklonale Antikörper für c-Src von Upstate Biotechnology, Inc., monoklonale Antikörper für Fak und  $\beta$ -3-Integrin von Transduction Laboratories, phosphospezifische polyklonale Antikörper für Fak und c-Src von Biosource International, Antikörper gegen Phosphotyrosin-RC 20:HRPO von Transduction Laboratories, gegen Phosphotyrosin (PY 99) von der Firma Santa Cruz, gegen Phosphotyrosin (PY 20) von der Firma Santa Cruz, monoklonale Antikörper gegen  $\beta$ -1-Integrin von der Firma Transduction Laboratories. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Blots fünfmal, jeweils für fünf Minuten, mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend ließ man die Blots in einem sekundären Antikörper der Firma Amersham eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren, welcher ebenfalls in TBST-Puffer gelöst war. Nachfolgend wurde wieder fünfmal je fünf Minuten, mit TBST gewaschen. Detektiert wurden die Proteine mit „enhanced chemiluminescence“ (ECL). Für die Detektion der phosphospezifischen Antikörper wurde in 1%-iger BSA-Lösung für 30 Minuten bei 37°C geblockt. Der zweite Antikörper, gegen Phosphotyrosin gerichtet, wurde für 30 Minuten bei 37°C dazugegeben. Wasch- und Detektionsbedingungen waren die gleichen wie oben beschrieben.

### **2.3 Herstellung von Mauslinien mit konditionalem beta.1- Integrin-knock-out**

Um den beta.1-Integrin-Rezeptor selektiv im Myokard auszuschalten, mussten konditionale knock-out-Mäuse mit Hilfe des Cre/Lox-P Systems gezüchtet werden. Der konventionelle knock-out des beta.1-Integrins (beta.1-/-) in allen Geweben führte zur Letalität im Embryonalstadium [29]. Durch Verpaarung von Mäusen, die die Rekombinase „Cre“ exprimierten, mit Mäusen, bei denen das Zielgen (beta.1-Integrin) von inserierten „loxP“-Sequenzen flankiert war, kam es durch die Cre-Rekombinase zum „Ausschneiden“ der Sequenz innerhalb der loxP-Schnittstellen und damit zum Verlust des Zielgens [81]. Bei der „Cre-Rekombinase“ handelt es sich um ein 38kDa großes Protein, welches erstmals aus dem Bakteriophagen P1 [89] isoliert wurde. Dieses Enzym kann man sowohl benutzen, um z.B. Punktmutationen zu induzieren, als auch zur Erzeugung von gewebespezifischen knock-out-Mäusen [90]. Dies gelingt wie oben erwähnt nur, wenn die entsprechende Genomsequenz von „loxP-Seiten“ flankiert ist. Die „loxP-Seiten“ sind 34 Basenpaare lang und beinhalten eine 13 Basenpaare lange, zueinander spiegelbildliche Wiederholung von Basen, die gemeinsam eine Kernregion umgeben [90]. Um nun gewebespezifisch Genomsequenzen ausschneiden zu können, müssen zwei solcher „loxP-Seiten“ in der gleichen Orientierung vorhanden sein. Dabei bindet ein einzelnes Cre-Rekombinase-Molekül jeweils an eine der beiden spiegelbildlich zueinander stehenden Seiten. In der Kernregion wird nun ein „Crossing-over“ gebildet und als zirkuläres Molekül ausgeschnitten. Indem nun die Expressierung der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle eines herzspezifischen Promotors gestellt wird, gelingt es, selektiv das beta.1-Integrin-Gen im Herzen auszuschalten. Dabei handelt es sich um den Promotor für das MLC2v-Gen („myosin-light-chain 2v“). Dieses Gen wird nur in Kardiomyozyten in den frühen Stadien der ventrikulären Differenzierung exprimiert [81]. Es ist in allen anderen Geweben nicht vorhanden. Auf diese Weise gelingt es, das beta.1-Integrin-Gen spezifisch im Herzmuskel auszuschalten.

Die Mäuse für den konditionalen knock-out von beta.1-Integrinen wurden bereits von Prof. Reinhard Fässler und Dr. Cord Brakebusch, Lund, Schweden, zur Verfügung gestellt [91,92]. Die Cre-Mäuse stammten von Dr. K. Chien, San Diego, CA, USA [93]. Ein letaler embryonaler Phänotyp wurde nicht erwartet, nachdem adulte chimere Mäuse mit einem nicht hundertprozentigen beta.1-Integrin-knock-out noch einen nor-

malen kardialen Phänotyp aufwiesen [94]. Folgende Verpaarungen wurden durchgeführt:

Heterozygote beta.1-Integrin-knock-out-Mäuse (beta.1 +/-) wurden mit heterozygoten Cre-MLC-2v-Mäusen (Cre +/-) zur Erzeugung der Genotyps beta.1 +/- : Cre +/- verpaart. Die Männchen dieser erhaltenen Zucht wurden nun mit weiblichen homozygot konditionalen (loxP) beta.1-Integrin-Mäusen (beta.1 k/k : Cre-/-) verpaart. Der erwünschte Genotyp dieser Zucht lautete: beta.1 -/k : Cre +/- . Damit wurde eine ca. 90%-ige Ausschaltung des beta.1-Integrins im Herzen erwartet. Zur leichteren Quantifizierung des konditionalen knock-out wurde zusätzlich zu den loxP-Schnittstellen das „lacZ-Gen“ inseriert, welches nach Ausschneiden des beta.1-Integrin-Gens aktiviert wird [92,94]. Das lacZ-Genprodukt (beta-Galactosidase) lässt sich durch eine Farbreaktion im Gewebe nachweisen.

### **2.3.1 Isolierung der DNA zur Genotypisierung**

Zur Isolierung der DNA wurden die Mäuseschwänze mit 80µl PCR-Puffer und 100µg/ml Proteinase K versetzt und über Nacht in einem mechanischen Schüttler bei 56°C verdaut. Anschließend wurden die Proben bei 95°C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Zur Gewinnung der DNA verwendeten wir das DNeasy™ Tissue Kit von der Firma Quiagen:

Die Proben wurden mit einem Gemisch aus 200µl Lösepuffer und 200µl Ethanol versetzt und anschließend gut vermischt. Danach wurde jeweils mit zwei verschiedenen Puffern der Firma Quiagen zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein frisches Röhrchen pipettiert. Wichtig dabei war es, dass die Membran vor der Elution absolut trocken war, da Ethanol, der sich in den verschiedenen Puffern befand, mit dem Elutionspuffer interferieren konnte. Im letzten Schritt wurde die DNA mit einem speziellen Elutionspuffer der Firma Quiagen ausgewaschen und der Gehalt an DNA im Photometer bei 260nm gemessen. Absorption und Konzentration einer Lösung sind miteinander über das Lambert-Beer-Gesetz verknüpft.

$$\lg I_0/I = A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

, mit  $I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichtes

$I$  = Intensität des gemessenen Lichtes

$A$  = Absorption

$\epsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient

$c$  = Konzentration der absorbierenden Moleküle in mol/l

$d$  = Länge der Messtrecke.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Annäherung zugrunde gelegt, dass ein  $A_{260} = 1$  einer Konzentration von  $\approx 50 \mu\text{g DNA/ml}$  entsprach. Daraus folgte:

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} = c \text{ (DNA, in ng}/\mu\text{l}).$$

Der Reinheitsgrad der DNA ergab sich aus dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$ . Er sollte mindestens 1,75 betragen, jedoch waren Werte größer 1,80 erstrebenswert. Geringere Werte deuteten auf eine Kontamination durch Proteine hin (50% Protein/50% DNA entsprechen einer  $A_{260}$  von  $\approx 1,5$ ). Entsprechend dem Gehalt an DNA wurde nun das notwendige Volumen für die Menge von  $0,5 \mu\text{g DNA}$  berechnet und jeweils in ein Röhrchen zur anschließenden Genotypisierung mittels PCR gegeben.

### 2.3.2 Genotypisierung durch PCR

Die PCR ist ein schnelles, nicht-radioaktives Verfahren um Mäuse zu genotypisieren. Der Vorteil der PCR liegt in ihrem geringeren Zeitaufwand im Vergleich zum „Southern Blot“ und in der Tatsache, dass theoretisch ein einzelnes DNA-Molekül ausreicht, um es zu amplifizieren („exponentielle Amplifikation“). Von Nachteil ist, dass die maximale Fragmentlänge in einem Größenbereich von 10kb liegt, gegenüber der größeren Fragmentlänge beim „Southern Blot“. Für alle PCR-Verfahren sind folgende Substanzen notwendig:

Eine geringe Menge an DNA, welche die gewünschte Sequenz enthält, die thermostabile Taq-Polymerase, eine Mischung aller vier Desoxynukleotide, zwei Oligonukleotidstartermoleküle („Primer“), sowie Reaktionspuffer. Die PCR läuft in folgenden Schritten ab:

### **Denaturierung**

Die DNA wird durch Hitze (94-96°C) denaturiert, das heißt, in ihre Einzelstränge zerlegt, welche im nächsten Schritt zu Vorlagen für die Primer und die Polymerase werden.

### **Anlagerung der Starter-Moleküle („Annealing der Primer“)**

Durch Temperatursenkung lässt man Oligonukleotid-Primer an die komplementären 5' und 3' Enden der Einzelstrang-DNA binden, die an diesen Stellen nun wieder doppelsträngig vorliegt.

### **Elongation**

Die Taq-Polymerase erkennt diese kurzen, doppelsträngigen Bereiche und beginnt dort in 5' → 3' Richtung mit der Synthese der komplementären Stränge.

Es wurden drei verschiedene Primerpaare eingesetzt. Mit dem ersten Primerpaar wurde spezifisch die Cre-Rekombinase detektiert. Im zweiten Durchgang wurden spezifische Primer für den konditionalen beta.1-Integrin-knock-out (kond.) verwendet. Mit diesem Primerpaar konnte auch der Wildtyp (WT) erkannt werden. Im dritten Durchgang wurden spezifische Primer für kompletten knock-out des beta.1-Integringens (beta.1 +/-) verwendet. Nur Mäuse, die alle drei Banden (Cre, beta.1 kond. beta.1 +/-) besitzen, sind genotypisch konditionale knock-out Mäuse.

Anschließend wurde nun ein „Master-Mix“ erstellt, der folgende Bestandteile beinhaltet:

0,4µl 10mM dNTP-Mix, 2µl 10-fachen PCR-Puffer, 1µl von jedem Primer der Konzentration 20pmol/µl, 0,4µl 1U/µl Taq DNA Polymerase und schließlich 12,2µl Wasser.

Anschließend wurden zu jedem „Tube“ 18µl des Master-Mixes gegeben. Wichtig war, gleichzeitig eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit anzusetzen. Die Proben wurden nun noch gemischt, zu jeder Probe ein Tropfen Mineralöl gegeben und die PCR gestartet. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C
2. Annealing für 30 Sekunden bei 65°C
3. Elongation für 30 Sekunden bei 72°C

Dieser Zyklus wurde zehnmal wiederholt, wobei bei jedem Schritt die Annealingtemperatur um 1°C verringert wurde.

4. Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C
5. Annealing für 30 Sekunden bei 55°C
6. Elongation für 30 Sekunden bei 72°C

Dieser Zyklus wurde vierzigmal wiederholt und die Proben anschließend bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt. Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Wir verwendeten bevorzugt einprozentige Agarosegele. Als Laufpuffer für Agarosegele diente 1×TAE-Puffer, welcher zur Visualisierung der DNA mit Ethidiumbromid versetzt wurde (ca. 0,5µg/ml). Dieses interkaliert zwischen die Basen und fluoresziert unter UV-Licht (254nm). Auf diese Weise lassen sich auch sehr kleine Mengen an DNA detektieren. Als Größenmarker wurde ein herkömmlicher „100-1000bp-DNA-Ladder“ der Firma Amersham verwendet. Als Probenvolumina wurden 20µl PCR-Produkt pro Spur aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 80 Volt. Nach der Elektrophorese (1,5-2 Stunden bei Raumtemperatur) wurden die Gele auf einem UV-Transluminator mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

## **2.4 Integrin alpha.v/beta.5-Inhibition in vivo**

Zum Einsatz eines von Dr. Beat Steiner (Fa. Roche, Basel) zur Verfügung gestellten selektiven alpha.v/beta.5-Integrininhibitors wurden osmotische Minipumpen (Firma Alzet, Palo Alto, USA) mit dem in 0,9% Kochsalz gelösten Inhibitor subkutan implantiert.

Bei diesen osmotischen Pumpen handelte es sich um Miniaturpumpen, welche den Inhibitor kontinuierlich und in kontrollierter Dosis in die Mäuse freisetzen. Subkutan implantiert stellen diese Pumpen eine optimale Lösung für die dauerhafte Zufuhr einer Substanz dar. Dies bedeutete vor allem eine Reduktion des Stresses für die Mäuse, welcher für sich alleine Auswirkungen auf den Ablauf der zu untersuchenden Signalwege haben konnte. Die ALZET-Pumpen setzten sich aus drei Bestandteilen zusammen:

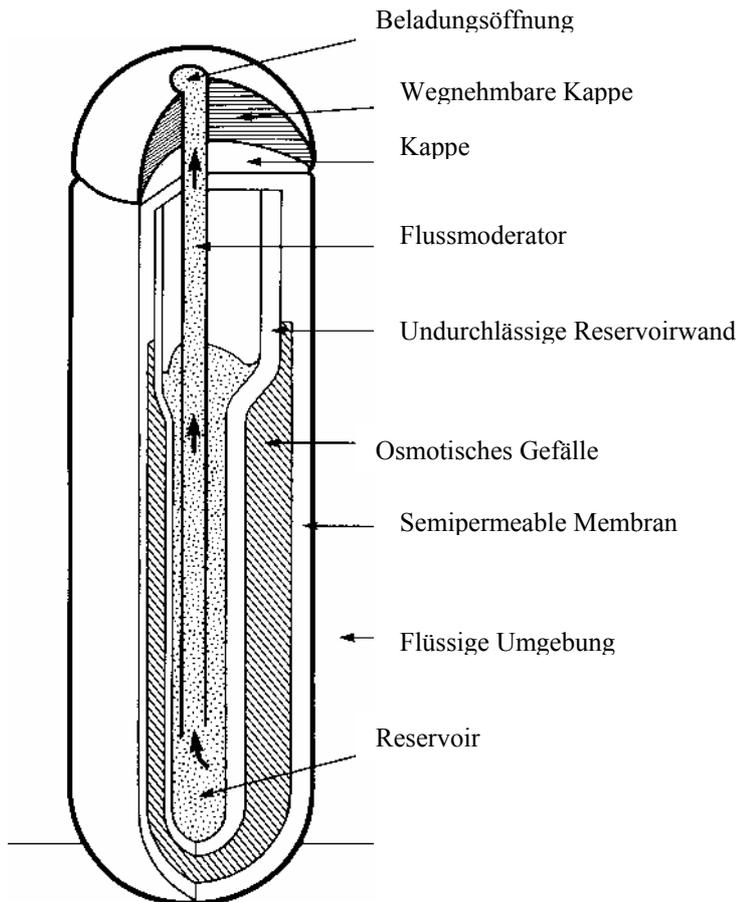


Abb.3

In dieser Abbildung ist der Aufbau einer osmotischen ALZET-Pumpe dargestellt. Die Pumpe setzt sich im Wesentlichen aus drei Kompartimenten zusammen: Substratreservoir, osmotische Brücke und semipermeable Membran.

Das Substratreservoir war ein zylindrischer Hohlraum, welcher keinen Austausch mit der osmotischen Flüssigkeit des Nachbarräumes erlaubte. Im Substratreservoir befand sich eine hohe Konzentration an Natriumchlorid. Diese war die treibende Kraft für den Substrataustausch. Wenn sich die Pumpe im Körper der Maus befand, strömte Wasser passiv durch die semipermeable Membran und komprimierte durch den entstehenden Druck das Substratreservoir. Dieses war sehr elastisch und gab den Inhibitor in das Gewebe ab. Die Rate, mit der der Inhibitor freigesetzt wurde, war direkt abhängig von der Wasserdurchlässigkeit der semipermeablen Membran und dem osmotischen Gradienten zwischen den beiden Räumen. Während das Volumen, welches pro Zeiteinheit freigegeben wurde, konstant war, ließ sich jedoch die Menge des Inhibitors, welcher freigesetzt wurde, steigern, indem man die Anfangskonzentration des Inhibitors erhöh-

te. Bei der Operation war es ganz wichtig, dass der Umgang mit sämtlichen Geräten sowie das Füllen der osmotischen Pumpen steril erfolgte. Als Kontrollgruppe im Hypertrophiemodell wurden Mäuse mit implantierter Pumpe und reiner Kochsalzlösung verwendet. Es sollten Plasmaspiegel von ca. 20µmol/l erreicht werden. Die Pumpen wurden jeweils zwei Tage vor Protokollbeginn implantiert, um die angestrebten Plasmaspiegel zu erreichen. Zur Dosisfindung wurden die Plasmaspiegel in Vorexperimenten mittels etabliertem Bioassay bestimmt. Dafür verwendeten wir 3T3-Mausfibroblasten, welche den alpha.v/beta.5-Integrinrezeptor exprimierten.

Zunächst wurde dafür eine 96-well-Platte mit jeweils 100µl Vitronektin pro well (gelöst in PBS) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Tag vor dem Assay teilten wir die Zellen auf. Anschließend wurden die Platten mit PBS gewaschen und 30 Minuten bei 37°C mit BSA der Konzentration 1mg/ml, welche in PBS gelöst war, geblockt. Dabei gaben wir ebenfalls 100µl dieser Lösung in jedes well. Danach wurde erneut gewaschen. Die Präparation der Zellen erfolgte folgendermaßen: Wir trypsinisierten die Zellen mit in PBS gelöstem Trypsin der Konzentration 0,1mg/ml. Anschließend wurde mit Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (0,5mg/ml) gewaschen. Die Zellen wurden nun so in 2mg/ml BSA-Lösung resuspendiert, dass eine Konzentration von ca.  $2,5 \times 10^5$ /ml erreicht wurde. Anschließend gaben wir in jedes well 100µl der Zellsuspension und ließen es bei 37°C für eine Stunde inkubieren. Die Platten wurden wieder mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Formalinlösung fixiert. Danach inkubierten wir die Zellen über Nacht mit einprozentigem Toluidine-Blau, gelöst in zehnprozentiger Formalinlösung. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit ausreichender Menge an destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit einer 2%-igen SDS-Lösung für 5-10 Minuten lysiert und darauf die Absorbtion im Photometer bei 600nm gemessen.

Es wurde mittlerweile nachgewiesen, dass monoklonale Antikörper gegen verschiedene Integrinuntereinheiten die normale Zelladhäsion unterbrechen können. Alternativ bestand die Möglichkeit über lösliche RGD-Peptid-Sequenzen, die den Zellen zugesetzt werden, eine Inhibition zu ermöglichen. Wie schon oben bereits erwähnt, verwendeten wir einen löslichen selektiven alpha.v/beta.5-Integrin-Inhibitor als modifiziertes RGD-Peptid von der Firma Roche, Basel. Um eine Inhibition zu erreichen, musste der Inhibitor in einer Konzentration von 1-10mg/ml zu den resuspendierten

Zellen (wie oben beschrieben) zugesetzt werden. Falls das Medium dadurch zu sauer wurde, gaben wir eine kleine Menge an Natrium-Hydrogenkarbonat dazu, bis sich das Medium pink verfärbte. Die nachfolgenden Schritte entsprachen dem oben beschriebenen Zelladhäsionsassay.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genotypisierung der Mäusezucht mittels PCR

Wie bereits oben erwähnt, wurden die Mäuse für den konditionalen knock-out von beta.1-Integrinen von Prof. Reinhard Fässler und Dr. Cord Brakebusch, Lund, Schweden, zur Verfügung gestellt. Die Cre-Mäuse stammten von Dr. K. Chien. Um diese Cre-Mäuse zu genotypisieren, verwendeten wir ein Primerpaar, welches von Chen et al. bereits etabliert war. Dabei untersuchten wir insgesamt 30 Mäuse. Die Cre-positiven Mäuse wurden anschließend weiterverpaart und die Cre-negativen Mäuse von der Zucht ausgeschlossen.

#### Genotypisierung der Cre-Mäuse



Abb.4

Die Abbildung zeigt repräsentativ die Genotypisierung der Cre-Mäuse, welche uns von Dr. K. Chien zur Verfügung gestellt wurden. Dabei ist ein Ausschnitt zu sehen mit einer Cre-positiven Maus und einer Verdünnungsreihe als Positivkontrolle.

Dabei hatte das Cre-Produkt eine Größe von 419 Basenpaaren. Um es nach der Agaroselektrophorese identifizieren zu können, ließen wir eine Verdünnungsreihe des Cre-Plasmides als Positivkontrolle mitlaufen. Die Verdünnungsreihe begann mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 und endete mit einem von 1:1000. Die Cre-Mäuse wurden nun mit heterozygoten beta.1-Integrin-knock-out-Mäusen verpaart (beta.1+/-). Für die Genotypisierung dieser Mäuse verwendeten wir ein Primerpaar, welches uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Reinhard Fässler vorgeschlagen wurde. Mit diesem Primerpaar konnte selektiv der heterozygote knock-out des beta.1-Integrin-Gens detektiert werden. Auch für die konditionalen (loxP) beta.1-Integrin-Mäuse benutzten wir ein Primerpaar, welches selektiv die loxP-Seiten detektierte. Als Positivkontrollen

benutzten wir die aus Schweden gelieferten, bereits genotypisierten Mäuse, welche uns zur Zucht zur Verfügung gestellt wurden. Zur endgültigen Genotypisierung wurde die PCR in drei einzelnen Schritten durchgeführt. Im ersten Durchgang benutzten wir zwei spezifische Primer für die Amplifizierung der „Cre-Rekombinase“. Diese hat eine Größe von 419bp und konnte mit Hilfe des Cre-Plasmides eindeutig zugeordnet werden. Als Negativkontrolle setzten wir DNA aus normalen NMRI-Mäusen ein und ließen diese mit den Primern für die „Cre-Rekombinase“ amplifizieren. Im zweiten Durchgang der PCR benutzten wir spezifische Primer für den heterozygoten konditionalen knock-out (c/+). Der Unterschied zwischen Wildtypmäusen und den konditionalen knock-out Mäusen war der, dass bei letzteren das  $\beta 1$ -Integrin-Gen von zwei loxP-Seiten flankiert war. Deshalb konnte mit diesem Primerpaar auch der Wildtyp detektiert werden. Als Negativkontrolle benutzten wir die DNA einer reinen Cre-Maus und ließen diese mit den Primern für den konditionalen knock-out amplifizieren. Als Positivkontrolle diente, wie oben beschrieben, die DNA einer bereits genotypisierten Maus aus Schweden. Im dritten und letzten Durchgang verwendeten wir ein Primerpaar für den kompletten heterozygoten knock-out (beta.1+/-). Als Negativkontrolle benutzten wir die DNA einer Wildtyp-Maus, die mit den Primern für den kompletten knock-out amplifizierte. Als Positivkontrolle diente auch hier die DNA einer bereits genotypisierten Maus.

### Genotypisierung der Zuchtmäuse

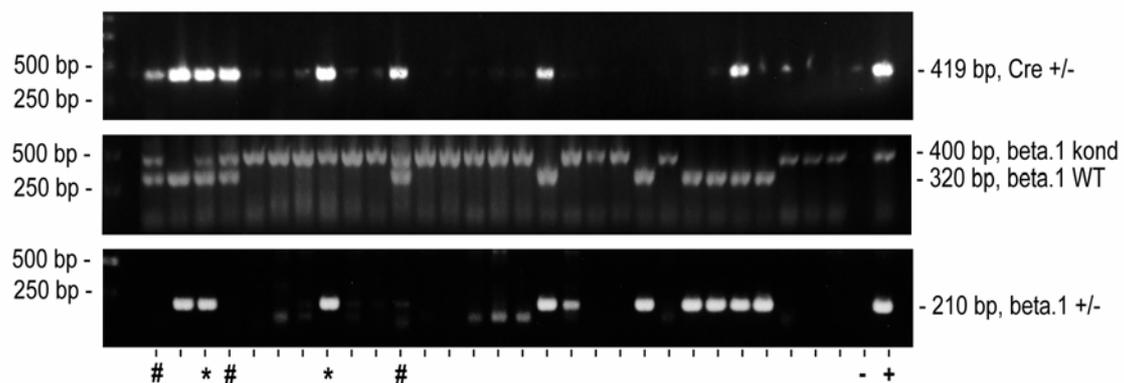


Abb.5

In dieser Abbildung sind drei verschiedene PCR-Durchgänge dargestellt, mit denen eine Genotypisierung der Zuchtmäuse erfolgte. Im ersten Durchgang wurden spezifische Primer für die Cre-Rekombinase verwendet. Im zweiten Durchgang benutzten wir spezifische Primer für den konditionalen knock-out (kond.). Mit diesem Primerpaar konnte auch der Wildtyp detektiert werden. Im dritten Durchgang wurden Primer für den kompletten knock-out (beta.1+/-) verwendet. Nur Mäuse, die alle drei Banden besitzen, sind genotypisch konditionale knock-out Mäuse.

Genotypisch konditionale knock-out-Mäuse waren nur diejenigen, welche in allen drei Banden übereinstimmten. Das bedeutete, dass diese Mäuse auf einem Allel den konditionalen knock-out besaßen, auf dem anderen Allel den kompletten knock-out und dass diese schließlich die „Cre-Rekombinase“ exprimierten (Genotyp:  $\beta 1$ -Integrin  $c/-$  : Cre  $+/-$ ).

Um zu überprüfen, ob die Genotypisierung auch phänotypisch umgesetzt wurde, benutzten wir im Western-Blot einen monoklonalen Antikörper gegen  $\beta 1$ -Integrin. Dieser detektierte selektiv dieses Protein und wir konnten eine deutliche Abnahme der Stärke der Banden vom Wildtyp über den konditionalen heterozygoten knock-out bis hin zum kompletten konditionalen knock-out des  $\beta 1$ -Integrins erkennen.

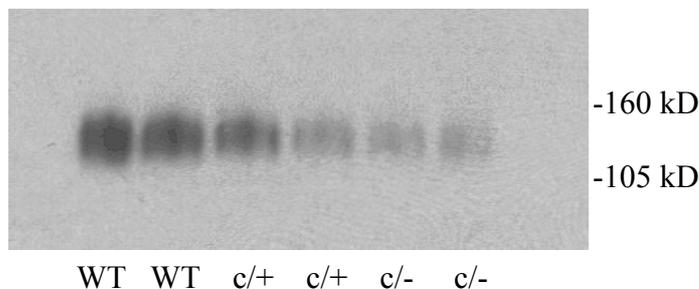


Abb.6  
Diese Abbildung zeigt den Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen  $\beta 1$ -Integrin. Dabei wurden jeweils zwei Wildtyp-Mäuse (WT), zwei heterozygot konditionale knock-out-Mäuse (c/+) und zwei komplette konditionale knock-out-Mäuse (c/-) verwendet.

### 3.2 Morphologische und hämodynamische Charakterisierung

Wir untersuchten insgesamt 70 Mäuse mit einem Gewicht zwischen 20 bis 35 g. Dabei wurden zwei Gruppen eingeteilt:

Zum einen die Mäuse, die wir einer transversalen Aortenkonstriktion mit einer 27g Nadel unterzogen, und zum anderen die „scheinoperierten“ Mäuse. Diese beiden Großgruppen wurden weiter unterteilt in operierte Mäuse nach 3, 7, 30 und 100 Tagen. Zur Beurteilung der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie berechneten wir den Quotienten aus dem Herzgewicht und der Tibiallänge und anschließend den Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

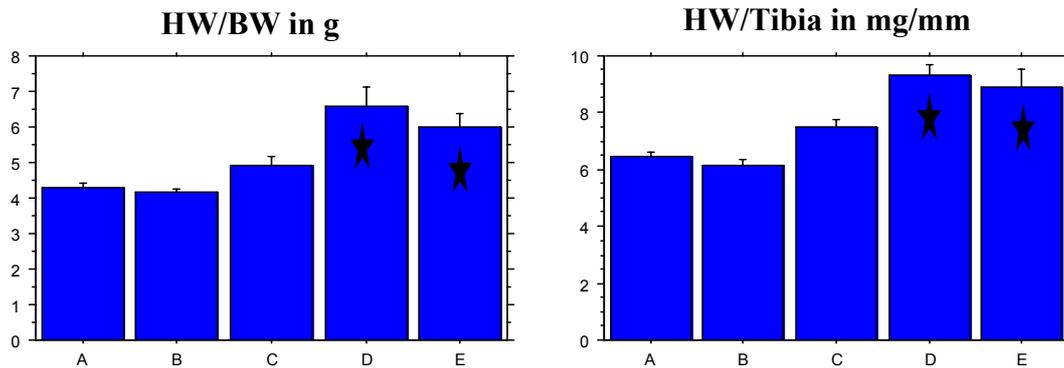


Abb.7 und 8

Morphologische und hämodynamische Charakterisierung der Mäuse nach Scheinoperation (A) oder Aortenkonstriktion (B-E) für 3-100 Tage (d). Verhältnis aus HW zu Körpergewicht (BW) in g (Abb.7), bzw. Herzgewicht (HW) in mg zu Tibialänge (Tibia) in mm (Abb.8).

A = sham, B = 3d, C = 7d, D = 30d, E = 100d. Statistiken für Abbildungen 7-13 wurden mit dem ANOVA-Test für signifikante Unterschiede, StatView Software, durchgeführt.

Dabei wurde deutlich, dass bei den Tieren nach „Aortenkonstriktion“ das relative Herzgewicht, sowohl bezogen auf die Tibialänge als auch auf das Körpergewicht, nach 30 Tagen signifikant anstieg. Verglichen wurden die Gruppen jeweils mit den scheinoperierten Mäusen. Beide Diagramme spiegeln einheitlich die Zunahme des relativen Herzgewichtes als Beweis für die Hypertrophie der Mäuseherzen wider. Keine signifikanten Unterschiede fanden wir für die in vivo gemessene Herzfrequenz, während der linksventrikuläre enddiastolische Druck nach 30 Tagen signifikant erhöht war und zu einem späteren Zeitpunkt wieder abfiel. Dabei kamen folgende Diagramme zustande:

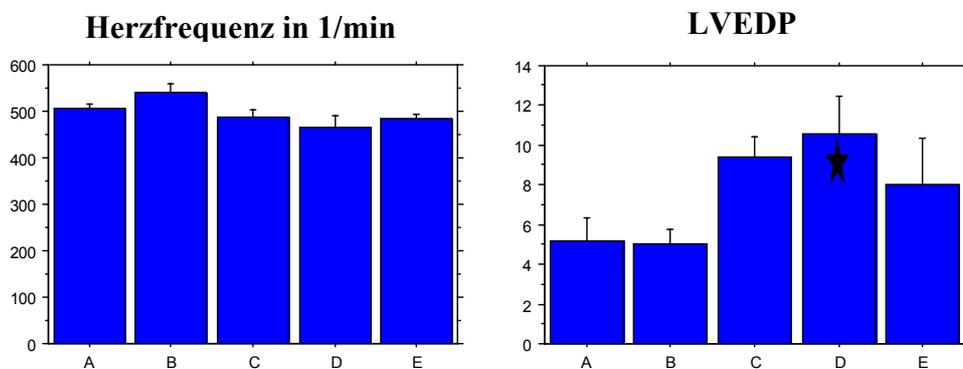


Abb.9 und 10

Herzfrequenz in Schlägen/Minute (Abb.9) und linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck (LVEDP) in mmHg (Abb.10). A = sham, B = 3d, C = 7d, D = 30d, E = 100d.

Diese beiden Diagramme spiegeln die Hypertrophieentwicklung der Mäuseherzen wider. Bei einer nahezu konstanten Herzfrequenz über einen Zeitraum von 100 Tagen ließ sich ein signifikanter Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druckes nach 30 Tagen nachweisen. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist als direkter Marker für die erhöhte Wandspannung im Ventrikel und der damit verbundenen Gefügedilatation sehr gut zur Beurteilung eines Hypertrophierungsprozesses geeignet. Die dabei konstant bleibende Herzfrequenz schließt andere Ursachen für die Entstehung einer Hypertrophie weitgehend aus. Darüber hinaus scheint noch keine manifeste Herzinsuffizienz vorzuliegen.

Wir fanden weiterhin eine signifikante Erhöhung des systolischen Blutdruckes bei den Tieren nach Aortenkonstriktion im Vergleich zu den „scheinoperierten“ Tieren nach 3, 7 und 30 Tagen, während er nach 100 Tagen wieder abfiel.

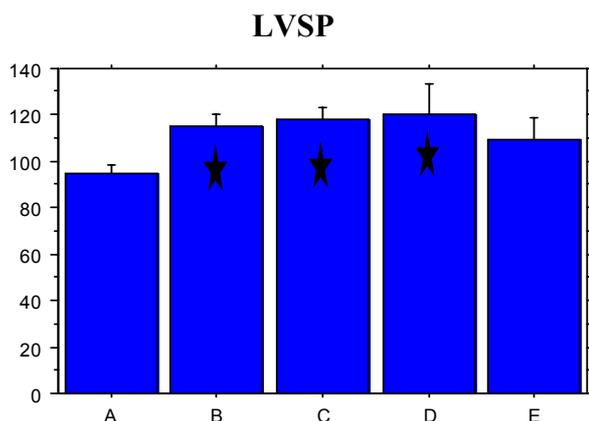


Abb.11  
 Linksventrikulärer systolischer Blutdruck (LVSP) in mmHg  
 A = sham, B = 3d, C = 7d, D = 30d,  
 E = 100d.

Der erhöhte linksventrikuläre systolische Druck zeigt die enorme Druckbelastung im linken Ventrikel des Mäuseherzens an. Nur ein suffizienter Ventrikel ist in der Lage, eine solche Druckbelastung zu kompensieren. Der Abfall des linksventrikulär systolischen Druckes nach 100 Tagen könnte ein Hinweis auf eine nun einsetzende Herzinsuffizienz sein.

Die Statistik für die Abbildung 7-13 (sham vs. AB) erfolgte mit dem ANOVA-Test und Bonferroni-Korrektur bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,0125$  für statistisch signifikante Unterschiede (★).

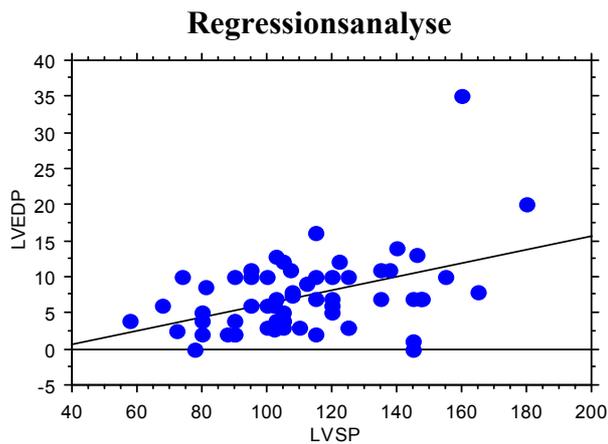


Abb.12  
Regressionsanalyse zwischen LVSP und LVEDP, Statistik mit ANOVA,  $p < 0,05$  für statistisch signifikante Korrelation.

Diese Regressionsanalyse soll nochmals den Zusammenhang zwischen dem Anstieg des linksventrikulär enddiastolischen und systolischen Druckes in den Herzen der Mäuse verdeutlichen. Weiterhin untersuchten wir das Einsetzen des Herzversagens. Dabei galten als Kriterien: gesteigertes Körpergewicht, die Entwicklung eines Lungenödems und exzessive kardiale Hypertrophie. Das Einsetzen dieser Kriterien beobachteten wir in einem Zeitraum zwischen 4 Wochen bis zu 3 Monaten. Im folgenden Diagramm wurde exemplarisch das totale Herzgewicht dargestellt:

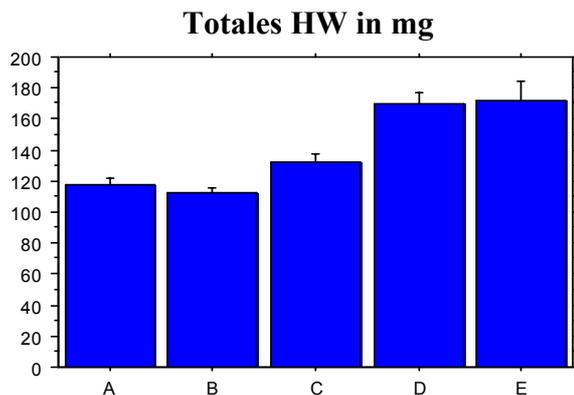


Abb.13  
Totales Herzgewicht der Mäuse nach Scheinoperation bzw. nach 3, 7, 30 und 100 Tagen Aortenkonstriktion.  
A = sham, B = 3d, C = 7d, D = 30d, E = 100d.

Wir beobachteten im selben Zeitraum eine deutliche Zunahme des Körpergewichtes der Mäuse, verglichen mit dem Gewicht vor der Operation (Diagramm nicht dargestellt). Es könnte sich dabei um eine zunehmende Ödemneigung bei den Tieren handeln. Da es jedoch für diesen Anstieg sehr viele Ursachen gibt, verfolgten wir diese Tatsache nicht weiter.

### 3.3 Western-Blot-Analysen

Die Western-Blot-Analysen ergaben folgende Daten:

Wie oben bereits erwähnt, untersuchten wir jeweils zwei verschiedene Gruppen von Mäusen, die sich in ihrem Gewicht unterschieden. Dabei hatte die Gruppe 1 ein Körpergewicht von 20-25g und die Gruppe 2 eines von 30-35g. Unsere erste Absicht war es herauszufinden, ob eine Veränderung in der Zusammensetzung und/oder der Expression der Extrazellulärmatrix während der druckinduzierten Hypertrophie der Mäuser Herzen stattfand. Dafür verwendeten wir Gewebeproben aus dem linken Ventrikel von Mäusen nach Aortenkonstriktion und von Kontrollmäusen. Aus diesen Geweben stellten wir, wie oben beschrieben, zwei verschiedene Fraktionen her und untersuchten eine Triton-X-100-lösliche und eine Triton-X-100-unlösliche Fraktion auf den Gehalt an folgenden Extrazellulärmatrix-Proteinen: Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen III. Vorzugsweise fanden wir erhöhte Raten an Fibronectin und Vitronectin und deren Assoziation mit dem Zytoskelett in Mäusen mit drucküberladendem linken Ventrikel im Vergleich zu „scheinoperierten“ Mäusen. Nachdem die Detergens-unlösliche Fraktion sehr oft den Integrin-vermittelten „fokalen Adhäsionskomplex“ enthielt, welcher potentiell am Hypertrophierungsprozess beteiligt war, untersuchten wir speziell diese Fraktion auf ihren Gehalt an verschiedenen Signalproteinen, welche bekanntermaßen auf die beschriebene Stimulation hin aktiviert wurden. Dabei zeigten sich im Western-Blot multiple Tyrosin-Phosphorylierungen bei 160, 125, 75 und 60 kD nach drei Tagen Aortenkonstriktion. Diese Banden fanden wir fast ausschließlich im Zytoskelett.

### Anti-Phosphotyrosin (RC-20)

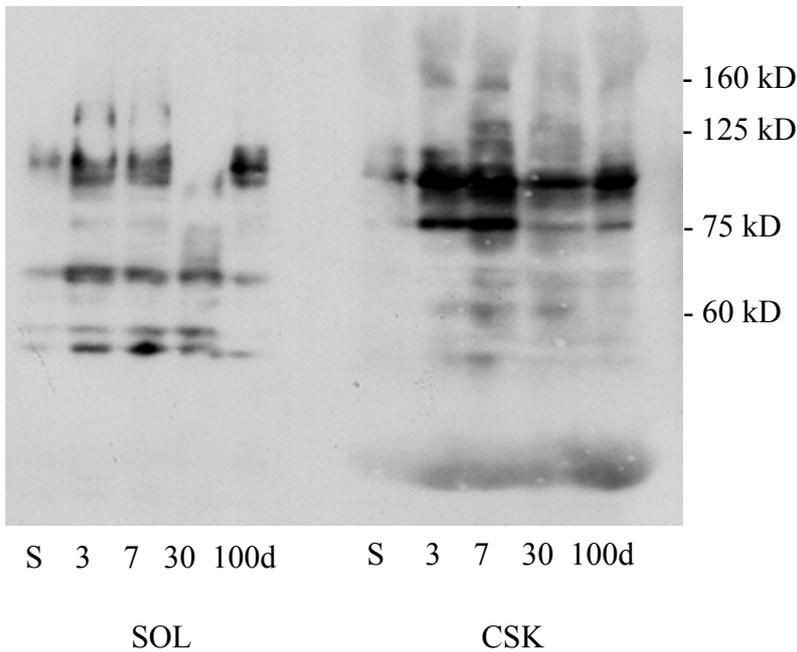


Abb. 14  
Western Blot von der Detergenz-löslichen (SOL) und der Detergenz-unlöslichen Fraktion (CSK). Dabei wurde jeweils das Herz einer scheinoperierten (S) Maus und die Herzen nach 3, 7, 30 und 100 Tagen Aortenkonstriktion eingesetzt. In dieser Analyse wurde ein Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosingruppen verschiedener Proteine verwendet. Die Banden lassen sich entsprechend ihrer Höhe verschiedenen Proteinen zuordnen

Die Phosphorylierung bestimmter Proteine in der löslichen Fraktion, wie in der Abbildung zu sehen, ließ sich unter anderem auf eine Integrin-unabhängige Aktivierung der Signaltransduktion oder auch auf die Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren zurückführen. Die deutlich stärkere Phosphorylierung im Zytoskelett dagegen deutete darauf hin, dass eine Aktivierung der Integrine und eine Formation des „fokalen Adhäsionskomplexes“ stattgefunden hatten. Zwei dieser Banden konnten wir mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern als zytoskelettassoziierte Tyrosinkinasen, Fak und c-Src identifizieren. Diese sind Bestandteil des sogenannten Integrin-abhängigen „fokalen Adhäsionskomplexes“. Fak zeigte zunächst eine deutliche Zunahme im Zytoskelett der schweren Tiere (30-35g). Fak hat eine Größe von 125 kD.

### Focal adhesion kinase (FAK)

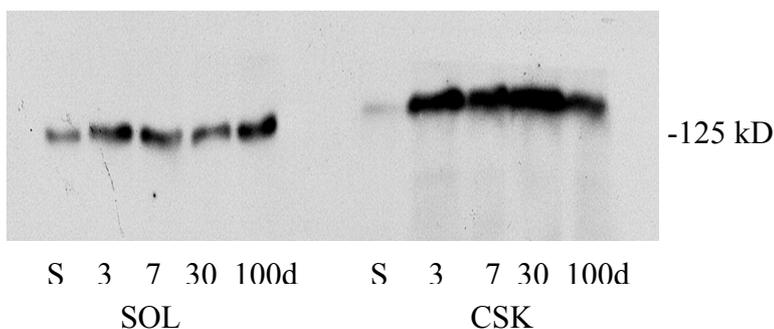


Abb.15  
Wie in Abb.14 beschrieben wurden durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen FAK die Banden diesem Protein zugewiesen.

Auch in dieser Abbildung sahen wir den starken Übertritt der „focal adhesion kinase“ in das Zytoskelett. Dies bestätigte die eben beschriebene Vermutung umso mehr, da Fak maßgeblich in die Signaltransduktionsprozesse verschiedener Integrinunterformen eingebunden war. Das gleiche Ergebnis fanden wir für c-Src. C-Src läuft in der Elektrophorese bei 60 kD.

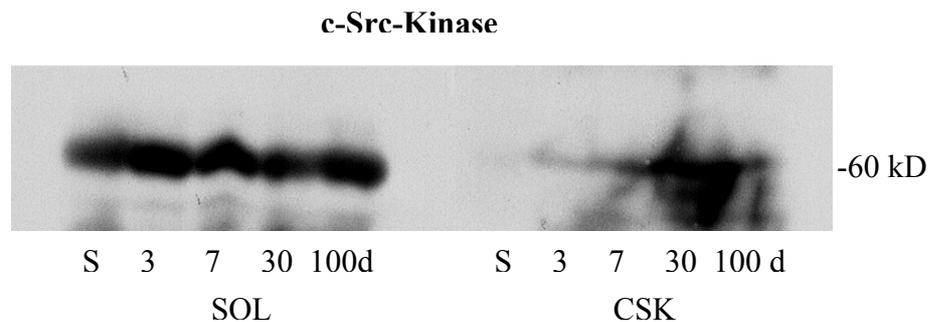


Abb.16  
Diese Abbildung zeigt einen Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-Src. Die Auftragung der Proteine ist den Ausführungen aus Abb.14 zu entnehmen.

Diese beiden Tyrosinkinase zeigten spezifische Phosphorylierungen. Fak zeigte Phosphorylierungen an den Stellen Tyr-397 und Tyr-925, c-Src zeigte Phosphorylierungen an der Stelle Tyr-418. Dies ließ darauf schließen, dass beide Tyrosinkinase aktiviert waren. Dies war darauf zurückzuführen, dass sich die beschriebenen Phosphorylierungen im katalytischen Zentrum der Enzyme befanden. Diese Beobachtungen bestätigten die bereits beschriebene Vermutung, dass die Phosphorylierung von Fak an der Stelle Tyr-397 eine Bindungsstelle für c-Src schaffte. Nachdem ein Komplex zwischen den beiden Komponenten gebildet war, wurde c-Src aktiviert und phosphorylierte nun seinerseits verschiedene Seiten von Fak, unter anderem an der Stelle Tyr-925, welche entscheidend für die Rekrutierung von Cas war. Um diese Tatsachen nachzuweisen, benutzten wir phosphospezifische Antikörper.

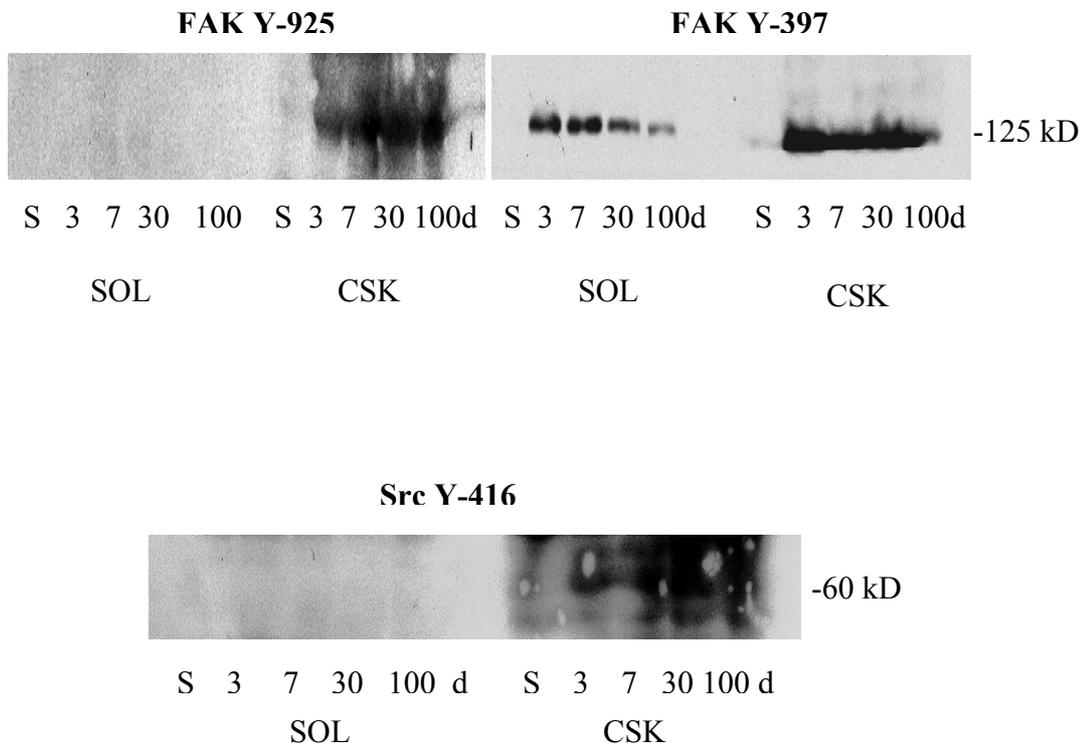


Abb.17, 18 und 19

Diese drei Abbildungen zeigen die Western Blots mit monoklonalen Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von Fak und Src. Dabei fällt auf, dass sich die aktivierten Proteine hauptsächlich im Zytoskelett wiederfinden.

In diesen drei Abbildungen fanden wir den deutlichsten Hinweis auf die Aktivität der phosphorylierten Proteine im Zytoskelett der Mäuseherzen.

### 3.5 In vitro Assay

Wie bereits oben beschrieben, war es zunächst wichtig, in Vorexperimenten Aussagen über äquivalente Dosen zwischen dem synthetischen Inhibitor Ro-65 2263 und einem herkömmlichen RGD-Peptid zu machen. Dabei inhibieren beide die Adhäsion von Zellen an eine mit Vitronektin beschichtete Platte via  $\alpha.v/\beta.5$ -Integrin-Blockade. Diese Dosisfindung war umso wichtiger, als es bisher keine etablierten Werte für Mäuseserum gab. So musste eine Dosis gefunden werden, die auf der einen Seite eine ausreichende Inhibierung des  $\alpha.v/\beta.5$ -Integrins gewährleistete und auf der anderen Seite für die Maus nicht toxisch war. Durch den Vergleich der Adhäsion

sionsinhibition mit einem herkömmlichen RGD-Peptid ergaben sich Konzentrationen zwischen 10µM und 1mM für den Inhibitor. Es wurde dabei die Zelldichte indirekt über die Absorbtion in einem Photometer bestimmt. Dabei ergab sich folgendes Diagramm:

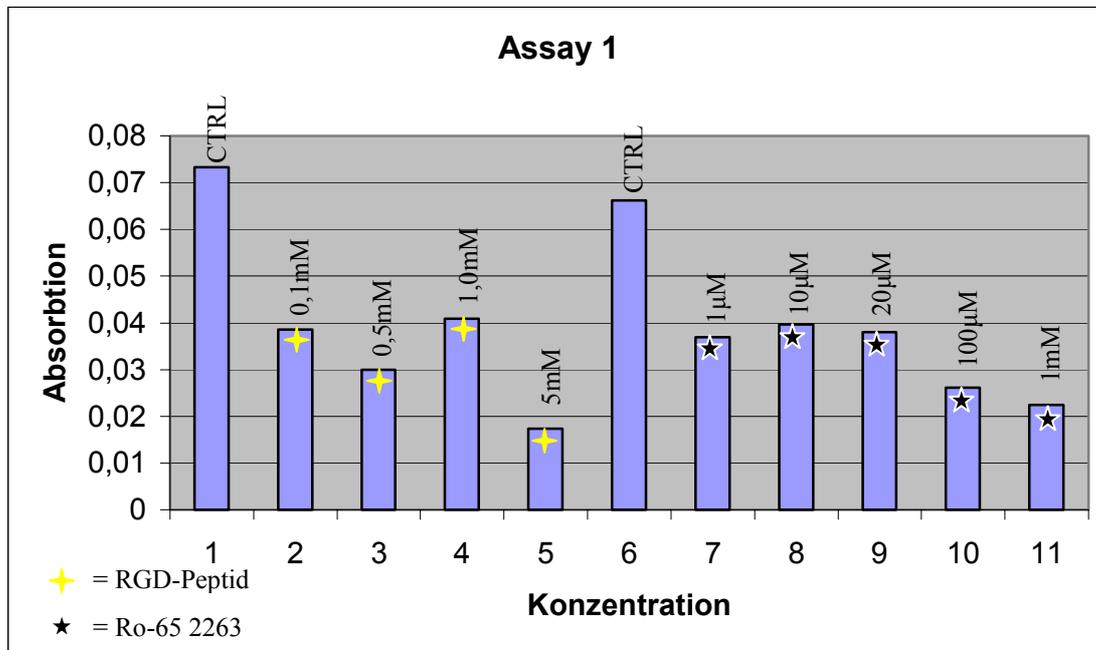


Abb.20

Dieses Diagramm veranschaulicht den Vergleich der Adhäsionsinhibition zwischen einem RGD-Peptid und dem spezifischen alpha.v/beta.5-Integrininhibitor in Abhängigkeit von der Konzentration. Die erste und die sechste Säule zeigen eine Kontrolle mit 85000 Zellen, die zweite bis fünfte Säule zeigen die Absorbtionswerte in Abhängigkeit von der Konzentration eines RGD-Peptids, während die siebte bis elfte Säule die Absorbtionswerte in Abhängigkeit von der Konzentration des spezifischen alpha.v/beta.5-Integrin-Inhibitors wiedergeben. Die Hintergrundabsorbtion wurde bereits abgezogen.

Es wird also deutlich, dass das RGD-Peptid und der synthetische Inhibitor Ro-65 2263 in den verwendeten Konzentrationen zu ähnlichen Absorbtionswerten führten. Das bedeutet, dass die beiden Substanzen im vorliegenden Adhäsionsassay ungefähr gleich viele Zellen daran hinderten, sich an die Vitronectin-beschichtete Platte anzuheften. Deshalb kann man darauf schließen, dass die einzusetzende Konzentration des Inhibitors zwischen 1µM und 1mM liegen musste. Wir wählten zunächst die Konzentrationen 20µM und 100µM für die implantierbaren Pumpen aus. Da es sich dabei jedoch um Anfangskonzentrationen des Inhibitors in den Pumpen und nicht um Serumkonzentrationen der Mäuse handelte, war es wichtig zu wissen, ob der Inhibitor überhaupt im Serum der Mäuse ankommt. Um dies nachzuweisen, verwendeten wir einen zwei-

ten in vitro Assay. Dabei wurde den Mäusen nach einem Zeitraum von einer Woche das Serum entnommen und in einem Inhibitionsassay mit dem reinen Inhibitor verglichen. Dabei kam folgendes Diagramm zustande:

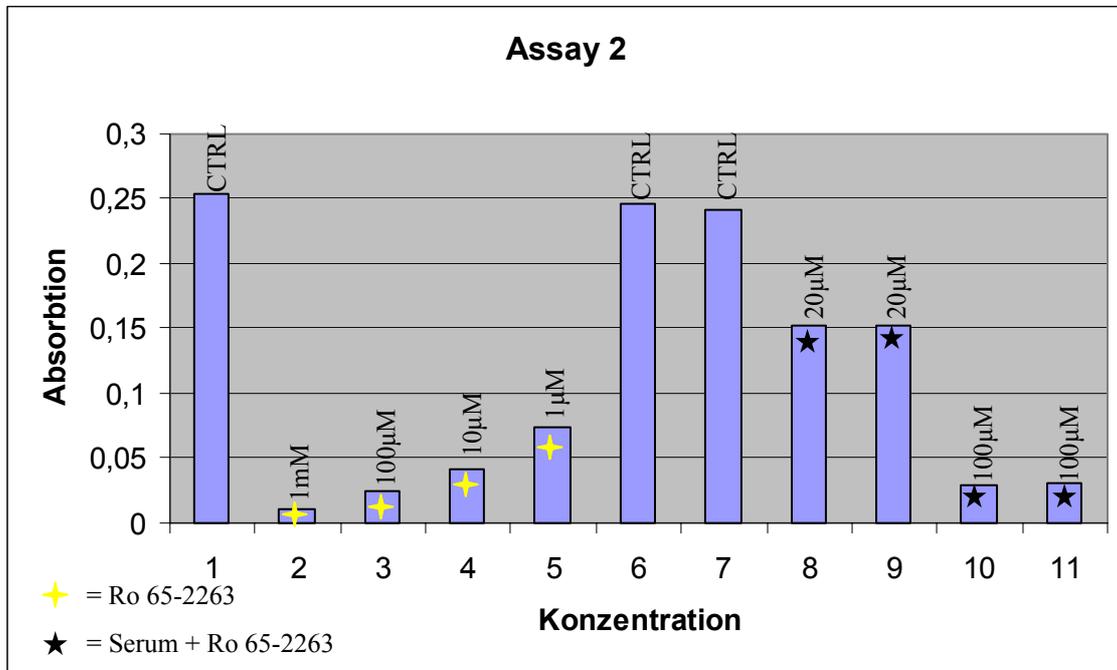


Abb.21

Dieses Diagramm veranschaulicht die Adhäsionsinhibition des gereinigten Mäuseserums in Abhängigkeit von der Konzentration des synthetischen Inhibitors in den implantierten Pumpen. Dabei beschränkten wir uns auf die Konzentrationen 20µM und 100µM (Säulen acht bis elf). Zum Vergleich wurde in den Säulen zwei bis fünf der reine Inhibitor den Zellen in abfallender Konzentration zugesetzt. Die Hintergrundabsorption wurde hier ebenfalls bereits abgezogen. Die Säulen eins, sechs und sieben stellen Kontrollen mit jeweils 85000 Zellen dar.

Durch dieses Diagramm ist nun eindeutig belegt, dass der alpha.v/beta.5-Integrin-Inhibitor im Serum der Mäuse ankommt und wirkt. Es zeigt darüber hinaus, dass der reine Inhibitor in einer Konzentration von 100µM etwa gleiche Absorbtionswerte erbrachte wie das Mäuseserum nach Implantation der Pumpen, welche den Inhibitor in der gleichen Konzentration enthielten. Dabei ist klar, dass die wirkliche Konzentration im Serum der Mäuse wesentlich niedriger sein musste als die der Pumpen. Die erforderliche Konzentration im Serum der Mäuse, die zu einer Inhibierung notwendig war, wurde also erreicht.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion des Tiermodells**

Wir benutzten ein Modell, mit welchem die initialen Schritte der Signaltransduktion bei der Hypertrophieentwicklung am Herzen untersucht werden sollten. Dabei bestand die wesentliche Aufgabe darin, das bereits beschriebene Katzenmodell des rechten Ventrikels nach Pulmonalarterienkonstriktion auf das Mausmodell des linken Ventrikels nach transversaler Aortenkonstriktion zu übertragen und nachzuweisen. Darüber hinaus bestand die Aufgabe, eine  $\beta 1$ -Integrin-knock-out Mauslinie zu züchten, um zu einem späteren Zeitpunkt Aussagen über die Rolle des  $\beta 1$ -Integrins bei der Hypertrophieentwicklung machen zu können. Eine weitere Aufgabe war es, in Vorexperimenten Aussagen über die Serumkonzentration und die Dosisfindung eines selektiven  $\alpha_v\beta 3$ -Integrin-Inhibitors treffen zu können. Dazu stand ein Zellkulturmodell mit 3T3-Mausfibroblasten zur Verfügung. Mit diesen beiden Modellen sollten zwei potentielle Wege der Informationsübertragung vom initialen Schritt der Drucküberlastung zu den intrazellulären Vorgängen bei der Hypertrophieentwicklung untersucht werden. Die zukünftigen Aufgaben sind es nun, die in dieser Arbeit beschriebenen Vorgänge nach Aortenkonstriktion an normalen NMRI-Mäusen mit denen der  $\beta 1$ -Integrin-knock-out Mäuse bzw. der Mäuse mit dem selektiven  $\alpha_v\beta 5$ -Integrin-Inhibitor zu vergleichen und zu charakterisieren.

#### **4.1.1 Grenzen des Mausmodells**

In der medizinischen Forschung greift man schon seit langem auf Versuchstiere zurück, um an ihnen menschliche Krankheiten zu studieren und neue Behandlungsmöglichkeiten auszuprobieren. Besonders die Hausmaus („*mus musculus*“) hat sich als Modell für viele Leiden des Menschen bewährt. Als Säugetiere stehen die Nager den Menschen verwandtschaftlich sehr nahe. Schätzungsweise 99 Prozent der Mausgene haben ein entsprechendes Pendant im menschlichen Erbgut. Ihr Genom ist mittlerweile so gut wie vollständig bekannt. Darüber hinaus sind Mäuse sehr pflegeleicht und billig. Die Züchtung einer knock-out-Mauslinie ist ein weiterer Vorteil, um den Einfluss eines bestimmten Gens in bestimmten Organen zu untersuchen. Allerdings gibt

es nicht für alle Krankheiten geeignete Modelle und von den Bestehenden sind nicht alle ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Wenn man die Physiologie der Mäuseherzen mit der der Menschenherzen vergleicht, fällt auf, dass es einige Unterschiede gibt, die die Aussagekraft dieses Tiermodells einschränken. So beträgt die Herzfrequenz der Maus circa das Zehnfache der menschlichen Herzfrequenz. Die Regulation des Herzrhythmus unterscheidet sich also deutlich. Inwieweit dies Auswirkungen auf den Grundmetabolismus des Herzens bei der einzelnen Spezies hat, ist unklar. Beim Menschen wäre eine solche Frequenz nicht denkbar, da sich die Auswurfraction des Ventrikels so stark verkleinern würde, dass eine ausreichende Blutversorgung des Körpers nicht mehr gewährleistet wäre. Des Weiteren unterscheiden sich die Histokompatibilitätsantigene der Maus, kurz MHC genannt, von denen des Menschen. Deren Einfluss auf Signaltransduktionsprozesse im Allgemeinen ist bis heute unklar, so dass auch hier Speziesunterschiede denkbar wären. Nicht zuletzt unterscheidet sich die Maus im Expressionsmuster verschiedener Integrinunterformen vom Menschen. Es ist deshalb möglich, dass die einzelne Gewichtung der Integrine, die am Signaltransduktionsprozess der Hypertrophie im Herzen beteiligt sind, ebenfalls gewissen Speziesunterschieden unterliegt. Der Mechanismus der Herzhypertrophie durch Drucküberlastung wurde in unserem Modell durch eine transversale Aortenkonstriktion simuliert. Ob dies ein geeignetes Modell für die menschliche Pathophysiologie bei Drucküberlastung darstellt, ist fraglich.

Dennoch ließ sich in dieser Arbeit eindeutig nachweisen, dass der Integrin-vermittelte Umbau der Extrazellulärmatrix und die damit verbundene Aktivierung verschiedener Signalwege von der Katze durchaus auf die Maus zu übertragen sind. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese grundlegenden Reaktionen im Hypertrophieprozess des Myokards auch beim Menschen ablaufen.

## **4.2 Linksventrikuläre Drucküberlastung an Mäuseherzen**

Mit diesem Modell gelang es uns, die wesentlichen Schritte der Signaltransduktion nach Drucküberlastung vom Katzenmodell auf das Mausmodell zu übertragen und nachzuweisen. Dabei beobachteten wir, dass es nach Drucküberlastung des linken Ventrikels zu multiplen Phosphorylierungen im Zytoskelett der Mäuse mit einem Körpergewicht >30g kam. Diese Beobachtung wurde bereits am Katzenmodell beschrie-

ben [79]. Wir konnten diese phosphorylierten Proteine als Zytoskelett-assoziierten Tyrosinkinase Fak und c-Src identifizieren. Phosphospezifische Antikörper erlaubten es uns, eine Aussage über die Aktivierung dieser Proteine zu machen. Die Ergebnisse, die wir dabei fanden, entsprachen ebenso denen am Katzenmodell [79]. Der Übertritt dieser aktivierten Proteine in das Zytoskelett gab einen starken Hinweis auf die Integrin-abhängige Aktivierung der Signaltransduktion. In unseren Versuchen hatte die Akkumulation der ECM-Proteine Fibronectin und Vitronectin der drucküberlasteten Mäuseherzen einen zeitlichen Zusammenhang zu der Bindung von c-Src und Fak im Zytoskelett dieser Mäuse. Es war nicht Teil dieser Arbeit festzulegen, ob diese ECM-Proteine von Kardiomyozyten oder von Fibroblasten sezerniert wurden. Von Bedeutung war jedoch die Tatsache, dass sich diese Proteine in der Detergenz-unlöslichen Fraktion wiederfanden und damit einen Hinweis auf deren Bindung mit Integrinen und der damit verbundenen Formation eines zytoskelettären Komplexes gaben. Wie bereits beschrieben, sind vor allem Fibronectin, Kollagen 1 und Laminin spezifische Liganden für das  $\alpha_5\beta_1$ - sowie das  $\alpha_3\beta_1$ - Integrin [95]. Des Weiteren ist längst bekannt, dass Integrine keine eigene Enzymaktivität besitzen, sondern ihre Signale über verschiedene nachgeschaltete Moleküle vermitteln. Dies sind unter anderem die Tyrosinkinase pp125 FAK und diverse kleine GTPasen wie z.B. Rho oder Rac [95]. Auf der anderen Seite ist Vitronectin als spezifischer Ligand für das  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin bekannt [67]. Auch hier ist es sehr wahrscheinlich, dass die Aktivierung der beiden Tyrosinkinase c-Src und Fak im Zytoskelett durch die Bindung der oben genannten Liganden eingeleitet wird. Die Aktivierung von Fak wird wahrscheinlich durch die Bindung der zytoskelettären Proteine talin und paxillin mit der zytoplasmatischen Komponente der Integrine vermittelt [67]. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung an der Stelle Tyr<sup>397</sup>, welche dadurch eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der Tyrosinkinase c-Src oder Fyn schafft. Dies führt zur Phosphorylierung von c-Src an der Stelle Tyr<sup>416</sup> und bewirkt damit die Aktivierung der Tyrosinkinase. C-Src phosphoryliert nun seinerseits Fak an der Stelle Tyr<sup>925</sup> und dies führt zu einigen Veränderungen in der Konformation von Fak, welche nun erst die Bindung von Cas an den Fak/c-Src-Komplex erlaubt [96]. Die Analyse unserer Daten, die wir von den drucküberlasteten Mäuseherzen erhielten, zeigte eine ähnliche Sequenz an Signalvorgängen während des Hypertrophierungsprozesses. Wenn man allerdings diese Ergebnisse mit Studien an adul-

ten Kardiomyozyten vergleicht, bei denen das Ziel war, die kardialen Integrinrezeptoren unabhängig von anderen Einflüssen, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Hormonen, zu stimulieren [79], fällt auf, dass es dabei nicht zu einer Aktivierung von zytoskelettärem c-Src kam. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es einen zusätzlichen Signalweg gibt, der im Mausmodell zur Aktivierung von c-Src führt. Ein solcher Signalweg könnte im drucküberlasteten Herzen z.B. durch Integrin-unabhängige Vorgänge aktiviert werden, oder durch das Teilhaben anderer Fibronectin/Vitronectin-Domänen, z.B. der Heparin-Bindungs-Domäne.

Mehrere frühere Studien zeigten, dass c-Src durch den Verlust der phosphorylierten Stelle Tyr<sup>527</sup>, die eine intramolekulare Inhibition bewirkt, aktiviert wird. Daneben werden jedoch noch andere Inhibierungsaktivitäten postuliert, z.B. in Form von kleinen Hitzeschockproteinen (HSP) und 5'-AMP. Gerade während der in vivo durchgeführten Drucküberlastung der Mäuseherzen könnte es im Gegensatz zum oben genannten Zellkulturmodell zu zusätzlichen Signalvorgängen kommen, welche die beschriebene Inhibition von c-Src vermeiden könnten. Die Aktivierung von c-Src und damit die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Substrate steht in engem Zusammenhang zum zytoskelettären Umbauprozess [97]. Eine wichtige Aufgabe des fokalen Adhäsionskomplexes ist die Aktivierung der sogenannten Ras/Raf/MAPK-Signalkaskade, d.h. einer Kettenreaktion verschiedener Übertragungsmoleküle. Diese Aktivierung ist abhängig von wichtigen Adaptermolekülen wie z.B. Shc, Grb-2 und Nck [98]. Obwohl die Integrin-initiierte Aktivierung dieser Signalkaskade abhängig ist von der Zusammensetzung des Zytoskeletts und möglicherweise viele kleine GTPasen mit einbezieht, ist die genaue Abfolge der einzelnen Schritte in der Signaltransduktion von Integrinen noch nicht genau bekannt. Sicher ist jedoch die Aktivierung der oben genannten MAP-Kinase-Signalkaskade. Dies wurde in einer Studie bewiesen, in der Fak in humanen Epithelzellen überexprimiert wurde [99]. Dabei kam es zu verstärkter c-Src-Kinase-Aktivität wie auch zu einer verstärkten Aktivierung der Fibronectin-induzierten Translation der sogenannten MAP-Kinase ERK2. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass Ras-Mutanten, die dieses Protein nicht bilden konnten, die selbige Aktivierung unterbrachen. Wie bereits vorbeschrieben, ist die Phosphorylierung von Fak an der Stelle Tyr<sup>925</sup> notwendig, um eine Bindungsstelle für die Adaptermoleküle Grb2 und Ras zu schaffen. Über diese Verbindung erhält die Tyrosinkinase Fak An-

schluss an das MAP-Kinase-System [67]. Da es auch bei unseren Untersuchungen zu einer deutlichen Phosphorylierung von Fak an der Stelle Tyr<sup>925</sup> kam, ist eine Aktivierung des MAP-Kinase-Systems im vorliegenden Fall sehr wahrscheinlich. Auf diese Weise erhalten die von uns untersuchten Integrine Anschluss an bereits beschriebene und etablierte Signalwege. Dadurch erhalten sie die Möglichkeit, regulierend in die Biosynthese verschiedener Proteine einzugreifen. Des Weiteren konnten Fak-Mutanten die Src-Kinase nicht stimulieren und erbrachten ebenfalls keine Aktivierung der MAP-Kinase ERK2. Dies ist als eindeutiger Hinweis darauf zu werten, dass die Aktivierung von c-Src und Ras notwendige Schritte in der Übertragung der Signaltransduktion auf ERK2 sind. Außerdem gibt es einige Integrine, insbesondere  $\beta$ 1- und  $\alpha_v$ -Isoformen, die die Tyrosinkinase Fyn und damit das Adaptermolekül Shc aktivieren. Dabei fungiert möglicherweise caveolin-1 als Membranadapter, welcher die  $\alpha$ -Untereinheit des Integrins an Fyn koppelt. Diese Koppelung der Integrine ist verantwortlich für die Aktivierung der (ERK)-MAP-Kinase-Kaskade. Dies ist als alternativer Weg zu verstehen und die Aktivierung der verschiedenen Signalwege hängt möglicherweise sowohl vom Zelltyp wie auch vom Stadium des Adhäsionsprozesses ab [67]. In dieser Studie wurde weiterhin der Beweis erbracht, dass der Komplex aus c-Src und Fak entscheidend für viele Signalvorgänge ist. Einer der weiteren Schritte nach dieser Arbeit wird es sein, die Assoziation dieser Proteine mit dem Zytoskelett und den Zusammenhang dieser Assoziation mit der Aktivierung von Fak und c-Src zu überprüfen. Wie bereits in Studien beschrieben, ist der Komplex von Fak und c-Src entscheidend für die Assoziation von Nck und Shc mit dem Zytoskelett [79]. Das basiert auf Beobachtungen an einem 2D-Zellkulturmodell (Kardiomyozyten wurden auf Laminin kultiviert), wo man sah, dass lösliches RGD-Peptid die Assoziation von Fak und c-Src nicht stimulieren konnte und die oben genannten Adapterproteine keinen Übertritt in das Zytoskelett zeigten. Dagegen konnte gezeigt werden, dass in einem 3D-Zellkulturmodell (Kardiomyozyten wurden auf Kollagen eingebettet) die zytoskelettäre Bindung der Adaptermoleküle möglich war und die Anwesenheit von Fak und c-Src verlangte, obwohl weder eine Aktivierung von c-Src noch die Tyr<sup>925</sup>-Phosphorylierung notwendig waren.

Insgesamt scheint es, dass die Bildung des fokalen Adhäsionskomplexes entscheidenden Einfluss auf die Umbauvorgänge in Zellen nimmt. Durch die gesteigerte Bildung

des fokalen Adhäsionskomplexes scheinen Signalproteine wie die Tyrosinkinase c-Src und Fak entscheidenden Einfluss auf die erhöhte Umsatzrate fokaler Adhäsionen im Rahmen der Umbauvorgänge des hypertrophierenden Myokards zu nehmen.

Um den Einfluss der Integrine und deren nachgeschaltete Signalwege im Myokard genauer untersuchen zu können, benutzen wir ein Tiermodell, welches es nun erlauben sollte, die beiden Integrinunterformen  $\beta_1$  und  $\beta_5$  detaillierter zu betrachten. Dies ist entscheidend, um den Anteil dieser beiden Integrinunterformen am Hypertrophierungsprozess des Myokards abschätzen zu können. Dazu dienten folgende zwei Wege:

Um das  $\beta_1$ -Integrin genauer untersuchen zu können, züchteten wir eine  $\beta_1$ -Integrin-knock-out-Mauslinie. Durch das Fehlen dieses Integrins im Herzen der Mäuse lassen sich nun Rückschlüsse auf dessen Funktion im Hypertrophierungsprozess schließen. Im Anschluss an diese Arbeit sollen diese Mäuse morphologisch wie hämodynamisch charakterisiert und auf Proteinebene untersucht werden. Dabei besteht prinzipiell die Möglichkeit das oben beschriebene Verfahren der transversalen Aortenkonstriktion auf die knock-out-Mäuse zu übertragen. Es ist dadurch möglich, den Hypertrophierungsprozess der Wildtyp-Mäuse mit dem der  $\beta_1$ -Integrin-knock-out-Mäuse zu vergleichen.

Das  $\beta_5$ -Integrin soll mit einem spezifischen Inhibitor ausgeschaltet werden. Pharmakologisch gesehen handelt es sich dabei um einen kompetitiven Antagonisten zu dem in der Extrazellulärmatrix reichlich vorhandenen RGD-Motiv. Auf Grund der kompetitiven Hemmung des  $\alpha_v\beta_5$ -Integrins war es sehr wichtig, zunächst eine ausreichende Konzentration des Inhibitors im Serum der Mäuse zu finden. Dazu diente der oben beschriebene *in vitro* Assay. Das zukünftige Ziel wird es sein, den Inhibitor bei Mäusen nach Aortenkonstriktion einzusetzen, um somit den Einfluss des  $\alpha_v\beta_5$ -Integrins genauer betrachten zu können.

### **4.3 Herstellung von konditionalen knock-out-Mäusen**

Wie bereits oben beschrieben, griffen wir bei der Herstellung unserer  $\beta_1$ -Integrin-knock-out-Mauslinie auf ein etabliertes System zurück, welches von Brakebusch et al. bereits beschrieben und publiziert wurde. Um überhaupt Einsichten in die Signaltransduktion einzelner Proteine im Tiermodell zu bekommen, ist es notwendig, diese in

einzelnen Geweben überzuexprimieren oder auszuschalten. Manchmal kann es erforderlich sein, dass ein Rest eines zu untersuchenden Proteins vorhanden bleibt, da der komplette Verlust dieses Proteins sonst zu Letalität im Embryonalstadium des Tieres führen würde. Um das alles zu vereinfachen, verwendeten wir das bereits etablierte Modell, bei dem mit Hilfe einer „knock-in“-Strategie die Cre-Expression unter die Kontrolle eines herzspezifischen Promotors (MLC-2v) gestellt wurde. Dieser Promotor ist nur im Embryonalstadium aktiv [81]. Dabei überleben die herzspezifischen beta-1-knock-out-Mäuse bis ins Erwachsenenalter im Gegensatz zu den traditionellen beta-1-knock-out-Mäusen, die schon im Embryonalstadium sterben. Die Tiere überleben nicht zuletzt auch deshalb, weil immer noch ein Rest dieses Proteins vorhanden ist. Dies liegt an der inkompletten Exzision des Gens durch die Cre-Rekombinase. Diese Tatsache stimmt auch mit früheren Studien überein, die die Cre-Rekombinase benutzen, um die Gene für „connexin 43 und gp130“ auszuschalten [93,100]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine weitere Reduktion des beta-1-Integrings in den Myozyten des Herzens in einer gestörten embryonalen Entwicklung des Herzens und damit in gesteigerter Letalität resultieren würde. Dies wird im Moment in Studien getestet, die Mäuse benutzen, bei denen die Cre-Rekombinase effizienter arbeitet als bisher.

In einer anderen Studie sah man, dass junge beta-1-knock-out-Mäuse nach Katheterisierung abnorme kardiale Funktionen zeigten [71]. Diese Mäuse konnten eine hämodynamische Belastung nicht tolerieren. Es wurde jedoch kein Hinweis auf eine morphometrische Hypertrophie oder eine fehlerhafte Zusammensetzung der Myozyten gefunden. Daraus zeigt sich, dass das beta-1-Integrin wichtig für die Mechanotransduktion in Kardiomyozyten ist. Die optimale Verbindung der Extrazellulärmatrix zum Zytoskelett durch beta-1-Integrine ist entscheidend für die Erhaltung der Funktion des einzelnen Myozyten. In der gleichen Studie kam es bei älteren Mäusen zu myokardialer Fibrose und zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie [71]. Dabei zeigten die Kardiomyozyten Membranveränderungen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer konstanten Rückkopplung zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett im schlagenden Herzen, welche durch Integrine gewährleistet wird. Geht diese Verbindung verloren, kommt es zum Verlust der Integrität der Myozyten und schließlich zur kardialen Nekrose und zum fibrotischen Umbau. Es ist bereits bekannt, dass Adhäsionen wichtig sind für das Überleben der Zellen. In unserem Fall bedeutet der Verlust

der Verbindung zur Extrazellulärmatrix für die Zellen das Eintreten der Apoptose, ein Prozess, welcher „Anoikis“ genannt wird. In der oben genannten Studie kam es nicht zu einer gesteigerten Apoptoserate [71].

Der Verlust des beta-1-Integrins führt zu Veränderungen in vielen  $\alpha\beta_1$ -Integrin-Dimeren, unter anderem des  $\alpha_1\beta_1$ -Integrins. Interessanterweise haben alpha-1-Integrin-knock-out-Mäuse eine verstärkte Expression an verschiedenen Matrix-metalloproteinasen (MMPs). MMPs sind, grob gesagt, an allen Umbauprozessen von Geweben beteiligt, unter anderem auch an Umbauprozessen während der Entwicklung von Kardiomyopathien. Somit erscheint es logisch, dass auch bei unseren beta-1-Integrin-knock-out-Mäusen derartige Veränderungen auftreten.

Weitere Parallelen können zwischen diesen Mäusen und Tieren mit Muskeldystrophien gezogen werden. Ähnlich wie Integrine, verbindet der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex die Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett. Mit dem Verlust dieses Komplexes kommt es zu Veränderungen an den Membranen der Zellen und eine Form der Kardiomyopathie kann resultieren. Der genaue Nachweis der Beteiligung von Integrinen an Skelettmuskeldystrophien konnte leider bisher nicht erbracht werden. Ferner ist es sehr interessant zu erwähnen, dass es in der Muskulatur von sogenannten „mdx“-Mäusen und Patienten mit Muskeldystrophien vom Typ Duchene und Becker zu einer verstärkten Expression von  $\alpha_7$ -Integrinen gekommen ist. Daraus ließe sich schließen, dass Integrine die verlorenen Komponenten des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes kompensieren könnten. Dies konnte aktuell in einem Mausmodell gezeigt werden, in welchem die Überexpression von  $\alpha_7$ -Integrinen die Symptomatik der Muskeldystrophie deutlich besserte. Darüber hinaus kommt es bei alpha-7-knock-out-Mäusen zur Entwicklung einer progressiven Skelettmuskeldystrophie. Seltsamerweise kommt es beim Fehlen dieses Integrins nicht zur verstärkten Expression des Dystrophin-Dystroglykan-Komplexes. Dadurch wird klar, dass diese beiden transmembranösen Proteine klar getrennte Funktionen besitzen. Das wird verdeutlicht durch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass Dystroglykan für die initiale Bindung an Laminin notwendig ist, während das beta-1-Integrin für die Assoziation des Laminins mit der Extrazellulärmatrix nach der Bindung gebraucht wird [101].

Das zeigt nochmals die Wichtigkeit der Integrine als Verbindung zwischen den Muskelfasern und der Extrazellulärmatrix. Die genaue Charakterisierung der Funktion ein-

zelter Integrine an der Herzmuskelzelle steht noch aus. Die dominierende Isoform des beta-1-Integrins am Herzen ist  $\beta_1D$ . Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass das  $\beta_1D$ -Integrin das  $\beta_1A$ -Integrin nicht in allen Organen ersetzen kann. Versucht man das, kommt es zur embryonalen Letalität mit verschiedensten Entwicklungsdefekten. Interessanterweise sollte die komplette Ausschaltung des  $\beta_1D$ -Integrins nur zu einem milden Phänotyp führen. Leider kann man mit unseren beta-1-Integrin-knock-out-Mäusen nicht zwischen diesen beiden Isoformen diskriminieren. Es wäre daher ein weiterer wichtiger Schritt, eine beta-1-Integrin-knock-out-Maus zu züchten, die es erlaubt, zwischen den beiden Isoformen zu unterscheiden.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Mutation von drei Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne des beta-1-Integrins zu einer verminderten Zellmigration führt [102]. Diese Zellmigration wird vornehmlich durch das  $\beta_1A$ -Integrin vermittelt. Es kam außerdem zur verminderten Fak-Phosphorylierung, was in Zusammenhang mit der verminderten Zellmigration gebracht wurde. Der Defekt der Phosphorylierung von Fak lag dabei im initialen Schritt der Autophosphorylierung. Weiterhin kam es nicht zur Phosphorylierung von tensin und paxillin, was in Zusammenhang stehen könnte mit der Fak-Aktivierung.

#### **4.4 Inhibierung des alpha.v/beta.5-Integrins**

Mit diesem Modell sollte es möglich sein, ein weiteres im Herzen exprimiertes Integrin funktionell auszuschalten. Die Grundlage dafür war die Annahme, dass diese Integrinunterform am Signaltransduktionsprozess im hypertrophierenden Myokard beteiligt ist. Dies wird entschieden gestützt durch Vorarbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass es 48 Stunden nach Drucküberlastung an Katzenherzen zu einer deutlich gesteigerten Aktivierung der Tyrosinkinasen Fak und c-Src kam [79]. Zum gleichen Zeitpunkt wurde in dieser Studie ein Übertritt von beta.5-Integrin in die zytoskelettäre Fraktion der lysierten Katzenherzen beobachtet. Dies legt dessen Beteiligung an der oben genannten Aktivierung der beiden Tyrosinkinasen nahe. Entgegen dieser Arbeit gibt es andere, die belegen, dass die alpha.v-Integrinkombinationen nur auf Fibroblasten exprimiert werden. Aus diesem Grund ist es umso wichtiger, ein Modell zu entwickeln, mit welchem die Funktion des alpha.v/beta.5-Integrins in vivo unter-

sucht werden kann. Es werden die zukünftigen Aufgaben sein, die Signalwege dieses Integrins genauer zu analysieren. Dazu sollen Untersuchungen an Mäusen beitragen, die einen selektiven alpha.v/beta.5-Integrininhibitor durch subkutan implantierte Pumpen systemisch infundiert bekommen. Diese Mäuse sollen sowohl morphologisch, hämodynamisch, wie auch auf Proteinebene charakterisiert werden. Darüber hinaus bestünde nun die Möglichkeit, den Inhibitor in beta.1-Integrin-knock-out-Mäusen anzuwenden und damit Aussagen über den summatorischen Effekt dieser Integrine zu machen.

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass kardiale Fibroblasten zu circa 80% mit dem alpha.v/beta.5-Integrin als Ligand für Vitronektin interagieren. Nur zu ca. 20% wurde das alpha.v/beta.3-Integrin als Interaktionspartner gefunden [103,104]. Möglicherweise erfüllen diese beiden Integrine wichtige Funktionen im Signaltransduktionsprozess der Kardiomyozyten. Eine weitere wichtige Aussage dieser Studie war die Induzierbarkeit des alpha.v/beta.3-Integrins durch Angiotensin II in kardialen Fibroblasten [103,104]. Dabei kam es zu einer gesteigerten Motilität der Fibroblasten, die sehr wichtig für den Hypertrophierungsprozess des Herzens ist. Es liegt nahe, dass Angiotensin II über die Stimulation des alpha.v/beta.3-Integrins auch in zelluläre Reaktionen der Kardiomyozyten eingreift. Aus unseren eigenen Untersuchungen geht hervor, dass vorzugsweise das alpha.v/beta.5-Integrin im Herzen exprimiert wird und an der Signaltransduktion beteiligt ist. Inwieweit hier Speziesunterschiede zwischen Maus und Mensch eine Rolle spielen, bleibt offen.

## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das von Laser et al. am rechten Ventrikel der Katze beschriebene Signaltransduktionsmodell in den wesentlichen Gesichtspunkten auf das Mausmodell des linken Ventrikels übertragen und nachgewiesen werden konnte. Die dabei beschriebenen Phosphorylierungen als Zeichen der Aktivität verschiedener Tyrosinkinasen konnten ebenfalls gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch hämodynamische Belastung induzierten Prozesse und die Bildung des „fokalen Adhäsionsprozesses“ auch am linken Ventrikel der Maus ablaufen.

Die Integrin-abhängige Induzierung dieser Prozesse konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden. Um diese Tatsache zu fokussieren, stehen zwei Modelle zur Verfügung:

auf der einen Seite das oben beschriebene beta-1-Integrin-knock-out-Modell, welches Einblicke in die beta-1-Integrin-vermittelte Mechanotransduktion bringen soll, auf der anderen Seite der synthetische  $\alpha_v\beta_5$ -Inhibitor, welcher nach Vorarbeiten im Serum der Tiere ankommt und damit Erkenntnisse in die Funktion des beta-3-Integrins an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen bringen soll.

Das klinische Ziel ist es, Informationen über die mannigfaltigen Signalwege im Hypertrophierungsprozess des Herzens zu erhalten. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren könnte somit der Übergang vom initialen Wachstumsreiz nach Druck- oder Volumenüberlastung in die manifeste Herzinsuffizienz reguliert und möglicherweise verhindert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adgey, A.A., *An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.* Eur Heart J, 1998. **19 Suppl D**: p. D10-21.
2. Bertrand, M.E., et al., *Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation.* Eur Heart J, 2002. **23**(23): p. 1809-40.
3. Sorbera, L., *Cilengitide.* Drugs of the future, 2000.
4. Mizejewski, *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns.* Proc Soc Exp Biol Med, 1999.
5. Brower, V., *Tumor angiogenesis: new drugs on the block.* Nature Biotechnology, 1998.
6. Burke, P.A., et al., *Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts.* Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4263-72.
7. Hornberger, L.K., et al., *Synthesis of extracellular matrix and adhesion through beta(1) integrins are critical for fetal ventricular myocyte proliferation.* Circ Res, 2000. **87**(6): p. 508-15.
8. Carver, W., L. Terracio, and T.K. Borg, *Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart.* Anat Rec, 1993. **236**(3): p. 511-20.
9. Carver, W., et al., *Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart.* J Histochem Cytochem, 1994. **42**(2): p. 167-75.
10. Goldsmith, E.C., et al., *Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2227-34.
11. George, E.L., H.S. Baldwin, and R.O. Hynes, *Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells.* Blood, 1997. **90**(8): p. 3073-81.
12. Hynes, R.O., *Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them?* Dev Biol, 1996. **180**(2): p. 402-12.
13. Kwee, L., et al., *Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice.* Development, 1995. **121**(2): p. 489-503.
14. Fassler, R., et al., *Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts.* J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 979-88.
15. Stephens, L.E., et al., *Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality.* Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1883-95.
16. Schaller, M.D., *Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1540**(1): p. 1-21.
17. Heidkamp, M.C., et al., *GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes.* Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1282-9.
18. Wu, C., et al., *Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix.* Cell, 1995. **83**(5): p. 715-24.
19. Ross, R.S., et al., *Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes.* Circ Res, 1998. **82**(11): p. 1160-72.
20. Ogawa, E., et al., *Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(5): p. 765-76.
21. Heling, A., et al., *Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium.* Circ Res, 2000. **86**(8): p. 846-53.
22. Schaper, J. and B. Speiser, *The extracellular matrix in the failing human heart.* Basic Res Cardiol, 1992. **87 Suppl 1**: p. 303-9.
23. Pelouch, V., et al., *Role of extracellular matrix proteins in heart function.* Mol Cell Biochem, 1993. **129**(2): p. 101-20.
24. Tagawa, H., et al., *Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy.* Circ Res, 1997. **80**(2): p. 281-9.
25. Tsutsui, H., K. Ishihara, and G.t. Cooper, *Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium.* Science, 1993. **260**(5108): p. 682-7.

26. Wang, N., J.P. Butler, and D.E. Ingber, *Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton*. Science, 1993. **260**(5111): p. 1124-7.
27. Kuppuswamy, D., et al., *Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4500-8.
28. Hsueh, W.A., R.E. Law, and Y.S. Do, *Integrins, adhesion, and cardiac remodeling*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 176-80.
29. Fassler, R., et al., *Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin*. J Cell Sci, 1996. **109 ( Pt 13)**: p. 2989-99.
30. Honda, H., et al., *Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 361-5.
31. Crabtree, G.R. and E.N. Olson, *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S67-79.
32. Molkenin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
33. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
34. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
35. Zhou, P., et al., *Solution structure of the core NFATC1/DNA complex*. Cell, 1998. **92**(5): p. 687-96.
36. Dufner, A., et al., *Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4525-34.
37. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 40-7.
38. Zhang, T., et al., *The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1261-7.
39. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 206-12.
40. Nicol, R.L., N. Frey, and E.N. Olson, *From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 179-223.
41. Bristow, M.R., et al., *Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts*. N Engl J Med, 1982. **307**(4): p. 205-11.
42. Rockman, H.A., et al., *Expression of a beta-adrenergic receptor kinase I inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7000-5.
43. Hunter, J.J., et al., *Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 23173-8.
44. Sugden, P.H. and A. Clerk, *"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium*. Circ Res, 1998. **83**(4): p. 345-52.
45. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
46. Henrich, C.J. and P.C. Simpson, *Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to alpha 1-adrenergic and phorbol ester stimulation*. J Mol Cell Cardiol, 1988. **20**(12): p. 1081-5.
47. Bowman, J.C., et al., *Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2189-95.
48. Pennica, D., et al., *Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10915-22.
49. Hoshijima, M. and K.R. Chien, *Mixed signals in heart failure: cancer rules*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 849-55.
50. Yamauchi-Takahara, K. and T. Kishimoto, *A novel role for STAT3 in cardiac remodeling*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(7): p. 298-303.
51. Kunisada, K., et al., *Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes*. Circulation, 1998. **98**(4): p. 346-52.

52. Kunisada, K., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 315-9.
53. Uozumi, H., et al., *gp130 plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 23115-9.
54. Lee, R.T., *Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(5): p. 202-5.
55. Chancey, A.L., et al., *Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1983-8.
56. Spinale, F.G., et al., *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1944-9.
57. Rohde, L.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3063-70.
58. Asakura, M., et al., *Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 35-40.
59. Medugorac, I., *Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium*. Cardiovasc Res, 1980. **14**(9): p. 551-4.
60. Rothermel, B.A., et al., *Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3328-33.
61. Hill, J.A., et al., *Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10251-5.
62. Brooks, P.C., et al., *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. Cell, 1998. **92**(3): p. 391-400.
63. Boudreau, N. and M.J. Bissell, *Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 640-6.
64. Schwarzbauer, J.E. and J.L. Sechler, *Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(5): p. 622-7.
65. Xia, M., et al., *Integrin-dependent role of human T cell matrix metalloproteinase activity in chemotaxis through a model basement membrane*. J Cell Biochem, 1996. **61**(3): p. 452-8.
66. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. **85**(5): p. 683-93.
67. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
68. Farrell, M.J. and M.L. Kirby, *Cell biology of cardiac development*. Int Rev Cytol, 2001. **202**: p. 99-158.
69. Markwald, R.R., *The role of extracellular matrix in cardiogenesis*. Tex Rep Biol Med, 1979. **39**: p. 249-51.
70. Payne, R.M., et al., *Toward a molecular understanding of congenital heart disease*. Circulation, 1995. **91**(2): p. 494-504.
71. Shai, S.Y., et al., *Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 458-64.
72. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms*. Cardiol Clin, 2000. **18**(3): p. 435-42.
73. Oliviero, P., et al., *Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 346-55.
74. Tyagi, S.C., *Physiology and homeostasis of extracellular matrix: cardiovascular adaptation and remodeling*. Pathophysiology, 2000. **7**(3): p. 177-182.
75. Farhadian, F., et al., *Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(4): p. 981-90.
76. Samuel, J.L., et al., *Accumulation of fetal fibronectin mRNAs during the development of rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1737-46.
77. Wagner, *Young Investigator's Prizewinner 2001. Direct visualization of the influence of normothermic as opposed to hypothermic cardiopulmonary bypass on the systemic microcirculation in neonatal piglets*. Cardiol Young. 2001 Sep;11(5):532-8., 2001.
78. Martinez, *[Development of a canine model of chronic progressive right ventricular hypertension]*. Arch Cardiol Mex. 2001 Oct-Dec;71(4):266-77., 2001.

79. Laser, M., et al., *Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35624-30.
80. Gu, H., et al., *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. Science, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
81. Chen, J., S.W. Kubalak, and K.R. Chien, *Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis*. Development, 1998. **125**(10): p. 1943-9.
82. O'Brien, T.X., K.J. Lee, and K.R. Chien, *Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5157-61.
83. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
84. Dyson, E., et al., *Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7386-90.
85. Shantz, L.M., D.J. Feith, and A.E. Pegg, *Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 25-32.
86. Laycock, S.K., et al., *Captopril and norepinephrine-induced hypertrophy and haemodynamics in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **27**(5): p. 667-72.
87. Rothermund, L., et al., *Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene*. J Hypertens, 2001. **19**(8): p. 1465-72.
88. Fraccarollo, D., et al., *Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling*. Circulation, 1997. **96**(11): p. 3963-73.
89. Sauer, B., *Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase*. Methods Enzymol, 1993. **225**: p. 890-900.
90. Kilby, N.J., M.R. Snaith, and J.A. Murray, *Site-specific recombinases: tools for genome engineering*. Trends Genet, 1993. **9**(12): p. 413-21.
91. Brakebusch, C., et al., *Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes*. Embo J, 2000. **19**(15): p. 3990-4003.
92. Potocnik, A.J., C. Brakebusch, and R. Fassler, *Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 653-63.
93. Hirota, H., et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. Cell, 1999. **97**(2): p. 189-98.
94. Fassler, R. and M. Meyer, *Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1896-908.
95. Ross, R.S. and T.K. Borg, *Integrins and the myocardium*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1112-9.
96. Polte, T.R. and S.K. Hanks, *Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5501-9.
97. Ishida, T., et al., *Agonist-stimulated cytoskeletal reorganization and signal transduction at focal adhesions in vascular smooth muscle cells require c-Src*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 789-97.
98. Wary, K.K., et al., *The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression*. Cell, 1996. **87**(4): p. 733-43.
99. Schlaepfer, D.D. and T. Hunter, *Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13189-95.
100. Gutstein, D.E., G.E. Morley, and G.I. Fishman, *Conditional gene targeting of connexin43: exploring the consequences of gap junction remodeling in the heart*. Cell Adhes Commun, 2001. **8**(4-6): p. 345-8.
101. Henry, M.D., et al., *Distinct roles for dystroglycan, beta1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1137-44.
102. Wennerberg, K., et al., *The cytoplasmic tyrosines of integrin subunit beta1 are involved in focal adhesion kinase activation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5758-65.

103. Schnee, J.M. and W.A. Hsueh, *Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 264-8.
104. Graf, K., et al., *Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts*. *Hypertension*, 2000. **35**(4): p. 978-84.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ADAM 12	a disintegrin and metalloprotease
Akt	Akt-Kinase
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
AT-1	Angiotensin-1
BW	body weight
CAS	CAS-Adapterprotein p130
Cre	causes recombination
CSK	cytoskelett
c-Src	c-Src-Kinase
CT-1	Cardiotrophin 1
EGF	epidermal growth factor
Erk	extracellular signal regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
Fak	focal adhesion kinase
FKBP 12	FK 506 binding protein 12
GDP	Guanosindiphosphat
Gp 130	Gp 130-Membranrezeptor
Grb-2	Grb-2-Adapterprotein
GSK-3	G-signaling kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon Deacetylasen
HW	heart weight
IEG	immediately early genes
Jnk	c-Jun kinase
Kb	kilobasen
kD	kilo Dalton
Kond.	Konditional
lacZ	β-Galaktosidasegen
loxP	Genlokus
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEF 2	myocyte enhancer factor
MHC	major histocompatibility complex/ myosin heavy chain
MLC-2v	myosin light chain-2v
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTor	mammilian target of rappamycin
Nck	Nck-Adapterprotein
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NMRI	Naval medical research institute
PCR	Polymerase chain reaction
PI-3	Phosphoinositol
PKA	Proteinkinase A

PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLP C	Phospholipase C
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf	c-Raf-kinase
Ras	Ras-kinase
RGD	Arg-Gly-Asp
RXR- $\alpha$	retinoid receptor $\alpha$
SAPK	stress activated protein kinase
Sham	scheinoperiert
Shc	Shc-Adapterprotein
SOL	solubale
$\beta$ -ARK	$\beta$ -Adrenozeptorkinase
STAT-3	signal transducer and activator of transduction-3
Taq	thermos aquaticus polymerase
TIMP	tissue inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tyr-	Tyrosin
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

## 7.2 Lösungen

### Name (Abkürzungen):

Phosphatpuffer (PBS10x)

### Zusammensetzung:

für 1 Liter:  
 2,0g KCl  
 2,0g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 80,0g NaCl  
 11,5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 21,7g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 pH 7,4 in Aqua dest.

Tris-Triton Lysis Puffer 2%

für 100ml  
 2,0ml Triton-X 100  
 380mg 10mM EGTA  
 200 $\mu$ l  $\text{NaVO}_3$  (1000x)  
 1,21g Tris-HCl (100mM)  
 pH 7,4 in Aqua dest.

SDS-Sammelpuffer (2x) 2%

für 40ml  
 19ml steriles Wasser  
 12ml Glycerol  
 4ml 20% SDS  
 5ml Tris/EDTA  
 617mg DTT

	einige Tropfen Pyronin Y
Tris-Puffer (1,5M)	für 500ml 91g Tris/base 300ml steriles Wasser 30,5ml konz. HCl pH 8,6
SDS-Lösung 20%	für 100ml 20g SDS
Tris/EDTA-Lösung	242mg 0,2M Tris-base/10ml H <sub>2</sub> O 74mg 0,02M EDTA/10ml H <sub>2</sub> O pH 8,0 in Aqua dest.
<b>Western Blot Puffer</b> SDS/PAGF-Elektrophorese-Puffer	für 2 Liter 12g Tris-bas 58g Glycine 10ml SDS 20% pH 8,6
Transfer-Puffer	für 4 Liter 12g Tris-base 58g Glycine 800ml Methanol
TBST (10x)	für 1 Liter 12,1g Tris-base 58,4g NaCl 15ml Tween-20 pH 7,5 in Aqua dest.
Stripping-Lösung	für 100ml 67g Guanidine-HCl (7M) 374mg Glycine (50mM) 1,86mg EDTA (0,05mM) 740mg KCl (0,1M) 156mg (oder 140µl) 2-Mercaptoethanol (20mM) pH 10,8 in Aqua dest.
Blockierlösung	Milchpulver 5% (fettfrei) 0,1 Vol% Tween-20 in Western-PBS pH 7,16

Primärantikörperlösung	Milchpulver 1% (fettfrei) In Western-PBS pH 7,45
Waschlösung 1	Primärantikörper Milchpulver 1% (fettfrei) Tween-20 0,1Vol% In Western-PBS pH 7,45
Sekundärantikörperlösung	Milchpulver 1% (fettfrei) Tween-20 0,1Vol% In Western PBS pH 7,45 Sekundärantikörper
Waschlösung 2	Milchpulver 1% (fettfrei) Tween-20 0,3Vol% In Western PBS pH 7,45
TBST-Puffer	Tris 10mM NaCl 0,1M Tween-20 0,1% pH 7,4
PBSA-Puffer	NaCl 137mM KCl 3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5mM HCl 0,05% pH 7,4 BSA 1%
TBSA-Puffer	NaCl 150mM Tris/HCl 20mM pH 7,6 NaN <sub>3</sub> 0,05% BSA 1%
TAE-Puffer	für 1 Liter Tris-base 242g Essigsäure 57,1ml EDTA 0,5M 100ml

### 7.3 Chemikalien, Materialien und Fertig-Kits

**Chemikalie/Material:**

Acrylamid  
Ak gegen Phosphotyrosin PY20  
Ak gegen Phosphotyrosin PY99  
Ak gegen Phosphotyrosin RC-20  
Aprotinin  
BIS (N,N'-Methylen-bis-Acrylamid)  
BSA  
DTT  
DTT  
E-64  
ECL-Kit  
EDTA  
EGTA  
Ethanol  
Filme für Western Blot  
Leupeptin  
Magermilchpulver  
Mercaptoethanol  
Monoklonale Ak gegen c-Src  
Monoklonale Ak gegen Fak  
Monoklonale Ak gegen  $\beta$ -1-Integrin  
Monoklonale Ak gegen  $\beta$ 3-Integrin  
MOPS  
NaCl 0,9%  
Natrium-Dodecyl-Sulphat (SDS)  
Natriumsäure  
Natriumvanadat  
Ocadaic Acid  
p-aminobenzamidine  
Pepstatin A  
Petrischalen  
Phosphospezifische polyklonale Ak gegen c-Src  
Phosphospezifische polyklonale Ak gegen Fak  
PMSF  
Polyklonale Ak gegen MAPK  
PVDF-Membran  
Sekundäre Ak  
Skalpell  
Sterilfilter  
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)  
Tubes/Caps  
Tween 20  
Whatman Papier

**Firma:**

Bio-Rad  
Santa Cruz  
Santa Cruz  
Transduction Laboratories  
Roche  
Bio-Rad  
Boehringer Mannheim  
Serva  
Sigma  
Roche  
Amersham  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
AGFA  
Sigma  
Freema  
Serva  
Upstate Biotechnology  
Transduction Laboratories  
Transduction Laboratories  
Transduction Laboratories  
Sigma  
Braun Melsungen AG  
Sigma  
Sigma  
Sigma  
Calbiochem  
Sigma  
Sigma  
Greiner  
Biosource International  
Biosource International  
Sigma  
Promega  
Millipore  
Amersham  
Medicon  
Millipore  
Bio-rad  
Eppendorf  
Sigma  
Whatman

## 7.4 Geräte

Elektrophorese-und Blottigkammer  
Entwicklungsmaschine  
Filmkassette mit Verstärkerfolien  
Fluoreszenzmikroskop  
Fluoreszenzphotometer  
Folien-Schweißgerät  
Fotodrucker  
Fotokamera  
Für 1,5/2ml Caps, Festwinkelrotor  
Für 10ml Tubes, Festwinkelrotor  
Für 50ml Tubes, Ausschwingrotor  
Glashomogenisator  
Inkubator Zellkultur  
Invers (Zellkulturen)  
Kipp-Shaker  
Küvetten  
Magnetrührer  
Mikroskope:  
Photometer  
Pipetten  
Power Supply Gerät  
Stabhomogenisator  
Sterilbank  
Sterilisator  
Thermocycler  
Ultraschallstab  
Ultrazentrifuge, Ausschwingrotor SW-T141  
Zentrifugen:

Bio Rad  
Agfa  
Agfa  
Zeiss, Axiovert  
Perkin Elmer  
Blauring, FS 500  
Fuji  
Pentax  
Eppendorf  
Sigma-2K15  
Beckmann  
Biomed B. Braun  
Labotec, Steri-Cult 200  
Leitz, Labovert  
Von Keutz  
Hellma  
Ikamag ret  
  
Shimadzu  
Eppendorf  
Biometra  
Braun Melsungen  
Bio-Flow  
Fedegari  
Biomed B. Braun  
Julabo  
Beckmann

Herrn Professor Dr. med. G. Ertl danke ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates.

Herrn PD Dr. med. J. Strotmann danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. med. M. Laser danke ich für die ausgezeichnete Betreuung.