



Aus der Klinik für Innere Medizin III  
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Professor Dr. M. Böhm

**Der Einfluss von Adenosin-A1-Rezeptor Aktivierung und Ausdauertraining auf  
kardiales Remodeling**

**The effect of adenosine-A1-receptor activation and endurance training on  
cardiac remodeling**

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2012

vorgelegt von: Sarah Lena Puhl  
geb. am: 25.03.83 in Delmenhorst

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Michael Menger

1. Berichterstattende: Professor Dr. Klaus Römer

2. Berichterstattende: Professor Dr. Michael Böhm

Homburg, den 26 Juli 2012

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.*

*Galileo Galilei*

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1 Hypertrophie .....	5
2.2 Die physiologische Hypertrophie.....	5
2.2.1 Signaltransduktion zur Induktion der physiologischen Hypertrophie .....	6
2.3 Die pathologische Hypertrophie .....	7
2.3.1 Modulation der kardialen Geometrie im Zuge des Remodelings.....	8
2.3.1.1 Effektoren der geometrischen Modulation im Zuge des Remodelings .....	9
2.3.1.1.1 Kollagene .....	10
2.3.1.1.2 Matrixmetalloproteinasen.....	10
2.3.2 Modulation der Gen-Expression im Zuge des Remodelings .....	12
2.3.2.1 „Early response“ Gene .....	12
2.3.2.2 Fetale Gene .....	12
2.3.3 Induktoren der pathologischen Hypertrophie .....	13
2.3.3.1 Oxidativer Stress.....	13
2.3.3.2 Inflammatorische Signale .....	14
2.3.3.3 Neurohumorale Aktivierung.....	15
2.3.4 Signaltransduktion zur Induktion der pathologischen Hypertrophie.....	15
2.3.4.1 Endokrine Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	16
2.3.4.1.1 Pro-hypertrophe Signaltransduktion über Gαq.....	17
2.3.4.1.2 Signaltransduktion down-stream von Gq .....	17
2.4 Prävention des maladaptiven Remodelings .....	20
2.4.1 Adenosin, der Kardioprotektor.....	20
2.4.1.1 Adenosin und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	21
2.4.1.1.1 Adenosin-vermittelte anti-fibrotische Effekte .....	22
2.4.1.1.2 Adenosin-vermittelte anti-inflammatorische Effekte .....	23
2.4.1.1.3 Adenosin-vermittelte anti-hypertrophe Effekte .....	23
2.4.1.1.3.1 Effektoren der Adenosin-vermittelten anti-hypertrophen Effekte in Folge α-adrenerger Stimulation .....	24
2.4.1.1.4 Adenosin-vermittelte Effekte auf die kardiale Geometrie .....	25
2.4.2 Kardioprotektion durch Ausdauersport .....	25
2.4.2.1 Einfluss von Ausdauersport auf den Remodeling-Prozess .....	26
2.4.2.2 Ausdauersport und Adenosin: Teamplayer?.....	28

---

2.5	Zielsetzung .....	29
2.5.1	Teilprojekt 1: Charakterisierung der Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	29
2.5.2	Teilprojekt 2: Untersuchungen zum Effekt körperlicher Aktivität vor und nach Myokardinfarkt auf den ventrikulären Remodeling-Prozess im Mausmodell mit besonderer Betrachtung der Adenosinrezeptoren und der extrazellulären Matrix .....	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
3.1	Material.....	33
3.1.1	Puffer und Lösungen.....	33
3.1.2	Nährmedien für die Zellkultur .....	35
3.1.3	„Kits“ .....	35
3.1.4	Enzyme.....	35
3.1.5	Synthetische Oligonukleotide (Primer) .....	35
3.1.5.1	Primer für semiquantitative PCR-Analysen.....	35
3.1.5.2	Primer für quantitative Real-Time PCR-Analysen.....	36
3.1.5.3	Sonden für quantitative TaqMan® PCR-Analysen aus Maus-cDNA .....	37
3.1.6	Größen- und Molekulargewichtsmarker.....	38
3.1.6.1	DNA-GrößenStandard.....	38
3.1.6.2	Molekulargewichtsmarker.....	38
3.1.7	Antikörper.....	39
3.1.7.1	Primärantikörper zur Immundetektion.....	39
3.1.7.2	Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion.....	40
3.1.7.3	Primärantikörper zur Immunhistochemie .....	40
3.1.7.4	Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper zur Immunhistochemie .....	40
3.1.8	Chemikalien und andere Materialien .....	40
3.1.9	Computersoftware.....	42
3.1.10	Statistik .....	42
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Zellkulturtechniken .....	42
3.2.1.1	Isolation neonataler Kardiomyozyten aus Rattenherzen.....	42
3.2.1.1.1	Bestimmung der Zellzahl .....	45
3.2.1.2	Kultivierung und Stimulation neonataler Kardiomyozyten für Protein- und RNA-Analysen .....	45
3.2.1.3	Kultivierung neonataler Kardiomyozyten für Radioaktivitätsmethoden.....	46
3.2.1.4	Kultivierung und Stimulation neonataler Kardiomyozyten für Immunfärbungen.....	46
3.2.2	Tiermodelle .....	47

---

3.2.2.1	Mauslinie und Tierhaltung .....	47
3.2.2.2	Tiermodell zur Induktion pathologischer Hypertrophie in Folge eines Myokardinfarktes in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen .....	47
3.2.2.2.1	Induktion des Myokardinfarktes .....	48
3.2.2.2.2	Sham-Operation .....	50
3.2.2.3	Tiermodell zur Induktion pathologischer Hypertrophie in Folge eines kontinuierlichen maladaptiven Stimulus .....	50
3.2.2.3.1	Subkutane Implantation osmotischer Mini-Pumpen .....	51
3.2.2.3.2	Explantation osmotischer Mini-Pumpen.....	52
3.2.3	<i>In vivo</i> Analysen .....	52
3.2.3.1	Echokardiographie .....	52
3.2.3.2	Magnet Resonanz Tomographie (MRT) .....	54
3.2.3.3	Blutdruckmessung mittels „Tail-Cuff-Methode“ .....	59
3.2.3.4	Tötung der Versuchstiere und Organentnahme.....	60
3.2.4	Proteintechniken .....	61
3.2.4.1	Proteinextraktion aus isolierten Kardiomyozyten .....	61
3.2.4.2	Proteinextraktion aus dem Myokard .....	61
3.2.4.3	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration .....	62
3.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
3.2.4.5	Western-Blot (Immuno-Blot) .....	63
3.2.4.6	Immundetektion.....	63
3.2.4.7	Densitrometrische Quantifizierung .....	64
3.2.5	RNA-Techniken.....	64
3.2.5.1	RNA-Extraktion aus isolierten Kardiomyozyten .....	64
3.2.5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA.....	64
3.2.5.3	RNA-Extraktion aus dem Myokard .....	65
3.2.5.4	cDNA-Synthese aus Kardiomyozyten-mRNA .....	65
3.2.5.5	cDNA-Synthese aus Gewebe-mRNA .....	66
3.2.6	DNA-Techniken.....	66
3.2.6.1	Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	66
3.2.6.1.1	PCR-Programme für semiquantitative PCR-Analysen .....	67
3.2.6.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	68
3.2.6.2	Quantitative Real-Time-PCR.....	68
3.2.6.2.1	Quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung interkalierender Farbstoffe .....	69
3.2.6.2.1.1	Ansatz für quantitative Real-Time-PCR-Analysen .....	70
3.2.6.2.1.2	PCR-Programme für quantitative Real-Time-PCR-Analysen.....	70

3.2.6.2.2	Quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan <sup>®</sup> -Sonden	71
3.2.6.2.2.1	Ansatz für quantitative TaqMan <sup>®</sup> -Analysen	71
3.2.6.2.2.2	PCR-Programm für quantitative TaqMan <sup>®</sup> -Analysen	72
3.2.6.2.3	Relative Quantifizierung der Genexpression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	72
3.2.7	Histologische Techniken	73
3.2.7.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	73
3.2.7.1.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten	74
3.2.7.1.2	Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten	75
3.2.7.1.3	Immunfärbungen von Paraffinschnitten gegen 8-Hydroxy-Diguanosin	76
3.2.7.2	Immunfärbung isolierter Kardiomyozyten gegen $\alpha$ -sarkomerisches Actinin	78
3.2.8	Radioaktivitätsmethoden	79
3.2.8.1	[ <sup>3</sup> H]-Leucin-Inkorporation	79
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>80</b>
4.1	Charakterisierung der Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Hypertrophie-Induktion <i>in vitro</i>	80
4.1.1	Das experimentelle System	80
4.1.2	Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der hypertrophen Antwort in neonatalen Kardiomyozyten	81
4.1.3	Expressionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation in neonatalen Kardiomyozyten	85
4.2	Untersuchungen zur Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge $\alpha$ -adrenerger Stimulation <i>in vivo</i>	89
4.2.1	Expressionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation <i>in vivo</i>	90
4.2.2	Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Induktion hypertropher Antworten im Mausmodell	91
4.2.3	Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Induktion fibrotischer Antworten im Mausmodell	97
4.2.4	Untersuchungen zur Identifizierung des Effektors der A1-Rezeptor-vermittelten Antagonisierung PE-induzierter maladaptiver Antworten	101
4.3	Untersuchungen zum Einfluss von Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt auf das linksventrikuläre Remodeling im Mausmodell mit besonderer Betrachtung der Rolle des Adenosinrezeptor-Systems und der extrazellulären Matrix	109
4.3.1	Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die kardiale Funktion und Morphologie	111

---

4.3.2	Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die Kardiomyozyten-Hypertrophie .....	123
4.3.3	Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die kardiale Fibrose .....	132
4.3.4	Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf Komponenten der PI3K- und der MAPK-Kaskade .....	138
4.3.5	Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach induziertem anterolateralem Myokardinfarkt auf die Expression des Adenosinrezeptor-Systems .....	146
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>151</b>
5.1	Hypothese Teilprojekt 1 .....	152
5.1.1	Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha$ 1-adrenerg induzierte Hypertrophie <i>in vitro</i> über einen Rückkopplungsmechanismus.....	152
5.1.2	Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha$ 1-adrenerg induzierte Hypertrophie <i>in vivo</i> .....	154
5.1.3	Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha$ 1-adrenerg induzierte Fibrose <i>in vivo</i> .....	156
5.1.4	Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors hemmt die $\alpha$ -adrenerg induzierte Aktivierung des Remodeling-Effektors MMP-2.....	157
5.1.5	Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors inhibiert das $\alpha$ -adrenerg induzierte Remodeling durch Hemmung von oxidativem Stress.....	158
5.1.6	Alpha-adrenerge Stimulation führt zur kompensatorischen Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems <i>in vivo</i> .....	161
5.1.7	Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 1 .....	162
5.2	Hypothese Teilprojekt 2 .....	165
5.2.1	Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen Einfluss auf adaptive Hypertrophie-Marker, schützt aber vor der Ausprägung maladaptiver Remodeling-Merkmale.....	165
5.2.1.1	Induktion eines anterolateralen Myokardinfarktes führt zur Induktion der Myokard-Hypertrophie, unabhängig vom physischen Aktivitätsstatus der Versuchstiere.....	166
5.2.1.2	Freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen schädigenden Einfluss auf die LV-Dilatation .....	167
5.2.1.3	Freiwilliges Training vor und nach Infarktinduktion wirkt der transmuralen Narbenausdünnung entgegen.....	168
5.2.1.4	Freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen Einfluss auf die ventrikuläre Funktion .....	171

---

5.2.1.5	Ausdauertraining vor und nach Infarktinduktion schützt bei moderaten Infarktgrößen vor der Reaktivierung fetaler Gene .....	173
5.2.1.6	Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt schwächt die pro-fibrotische Antwort und die Infarktexpansion ab .....	174
5.2.2	Die Hypertrophie-Induktion in Folge chronischer Volumenbelastung ist mit der Aktivierung des PI3K-Signalwegs assoziiert .....	176
5.2.3	ERK ist an der Induktion der pathologischen, nicht der physiologischen Hypertrophie beteiligt.....	177
5.2.4	Induktion eines Myokardinfarktes in körperlich aktiven Mäusen hemmt das Adenosinrezeptor-System.....	178
5.2.5	Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 2.....	180
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>183</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>197</b>
7.1	Abstract-Publikationen .....	197
7.2	Originalarbeiten.....	198
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>200</b>

Abb. 1: Signaltransduktion zur Induktion der physiologischen Hypertrophie .....	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der Morphologie der pathologischen konzentrischen und exzentrischen Hypertrophie und des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt .....	9
Abb. 3: Neurohumoral/ $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Signaltransduktion down-stream von G $\alpha_q$ /11 .....	19
Abb. 4: Auswahl Adenosin-vermittelter Effekte unter physiologischen und pathologischen Bedingungen und Rezeptor-Subtypen, die an den jeweiligen Wirkungen vorrangig beteiligt sind.....	21
Abb. 5: Schematische Darstellung der Fragestellung .....	32
Abb. 6: DNA-GrößenStandard 100 bp DNA Leiter der Firma PeqLab.....	38
Abb. 7: RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, vorgefärbte Proteinleiter der Firma GE Healthcare .....	38
Abb. 8: Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung in parasternaler Längsachsenprojektion und zugehörige M-Mode Aufzeichnung einer 14-wöchigen C57/BL6 Wildtyp-Maus .....	54
Abb. 9: Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung in mittventrikulärer Kurzachsenprojektion und zugehörige M-Mode Aufzeichnung einer 14-wöchigen C57/BL6 Wildtyp-Maus .....	54
Abb. 10: Längsachsenprojektion (4-Kammer-Blick) im „bright blood“-Modus einer 14- wöchigen C57/BL6 Wildtyp-Maus in der Enddiastole (links) und der Endsystole (rechts) .....	57
Abb. 11: Kurzachsenprojektion (2-Kammer-Blick) von 6 konsekutiven Sequenzen zur Darstellung des gesamten linken Ventrikels im „bright blood“ –Modus einer 14 Wochen alten, männlichen C57/BL6 Wildtyp-Maus in der Enddiastole.....	57
Abb. 12: Kurzachsenprojektion (2-Kammer-Blick) von 6 konsekutiven Sequenzen zur Darstellung des gesamten linken Ventrikels im „bright blood“ –Modus einer 14 Wochen alten, männlichen C57/BL6 Wildtyp-Maus in der Endsystole.....	58
Abb. 13: Einteilung der linksventrikulären Wände in 4 Sektoren .....	59
Abb. 14: Methodisches Vorgehen zur Analyse des Einflusses einer A1-Rezeptor-Aktivierung auf den kardiomyozytären Phänotyp infolge pro-hypertropher Stimulation.....	81
Abb. 15: A1-Rezeptor-Aktivierung hemmt die PE-induzierte Transkriptionssteigerung des immediate early Gens c-fos .....	82
Abb. 16: A1-Rezeptor-Aktivierung hemmt die PE-, nicht aber die AngII- oder Igf-I-induzierte Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und der Proteinbiosyntheserate.....	83
Abb. 17: A1-Rezeptor-Aktivierung hemmt die PE-, nicht aber die AngII- oder Igf-I-vermittelte Zunahme der kardiomyozytären Sarkomerorganisation.....	84

Abb. 18: Die mRNA-Expression des A1-Rezeptors unterliegt einer Heraufregulation durch $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation.....	85
Abb. 19: Die mRNA-Expression der Adenosinrezeptor-Subtypen A2a, A2b und A3 unterliegt keiner Regulation durch $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation .....	86
Abb. 20: Die mRNA-Expressionszunahme des A1-Rezeptors ist spezifisch für $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation.....	87
Abb. 21: Die Protein-Expression des A1-Rezeptors unterliegt einer Dosis-abhängigen Heraufregulation durch den $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus PE.....	88
Abb. 22: Studiendesign zur funktionellen und expressionellen Analyse des A1-Rezeptors im Zuge $\alpha_1$ -adrenerg induzierter Hypertrophie im Mausmodell .....	89
Abb. 23: Kontinuierliche $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation im Mausmodell führt zur Expressionszunahme des gesamten Adenosinrezeptor-Systems auf Proteinebene .....	90
Abb. 24: Kontinuierliche A1-Rezeptor-Aktivierung wirkt der PE-vermittelten Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses entgegen .....	91
Abb. 25: Kontinuierliche A1-Aktivierung inhibiert die PE-induzierte Größenzunahme der Kardiomyozyten.....	93
Abb. 26: Kontinuierliche A1-Aktivierung antagonisiert die $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Re-Expression der fetalen Gene ANF und $\beta$ -MHC und den $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten MHC-Expressions-Shift.....	94
Abb. 27: Aktivierung des A1-Rezeptors inhibiert die $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-induzierte interstitielle Fibrose .....	97
Abb. 28: Kontinuierliche Aktivierung des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors führt tendenziell zur transkriptionellen Heraufregulation pro-fibrotischer Faktoren.....	99
Abb. 29: Aktivierung des A1-Rezeptors wirkt der PE-vermittelten Expressionszunahme der aktiven MMP-2 entgegen.....	100
Abb. 30: Aktivierung von ERK44 unterliegt einer negativen Regulation durch kontinuierliche Aktivierung des A1- und des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors.....	102
Abb. 31: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors verschiebt das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver ERK44 in Richtung der inaktiven Isoform .....	103
Abb. 32: Expression und Aktivierung der Proteinkinase AKT unterliegt keinem Einfluss durch Aktivierung des A1- und des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors.....	104
Abb. 33: Co-Stimulation des A1- und des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors führt zur Verschiebung des pP70S6K/ .....	105
Abb. 34: Gesamtexpression der aktiven GSK3 $\beta$ unterliegt einer Heraufregulation durch simultane Aktivierung des A1- und des $\alpha_1$ -Adrenorezeptors .....	106

---

Abb. 35: A1-Rezeptor-Aktivierung inhibiert die PE-induzierte ROS-Produktion in Kardiomyozyten und nicht-myozytären Herzzellen.....	108
Abb. 36: Studiendesign zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps und der Adenosinrezeptor-Expression nach Induktion pathologischer Hypertrophie in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen .....	110
Abb. 37: Exemplarische Vierkammerblicke untrainierter und trainierter Mäuse 4 Wochen nach Infarktinduktion bzw. Sham-Operation.....	115
Abb. 38: Exemplarische Vierkammerblicke untrainierter und trainierter Mäuse vor und 4 Wochen nach Infarktinduktion.....	116
Abb. 39: Induktion eines anterolateralem Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven Tieren tendenziell zur stärkeren Ausdünnung der linksventrikulären Vorderwand.....	118
Abb. 40: Ausdauertraining schützt vor infarktinduzierter Ausdünnung der Vorderwand .....	120
Abb. 41: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven und aktiven Mäusen zur Ausprägung morphologischer Hypertrophie-Marker .....	124
Abb. 42: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven und aktiven Mäusen zur Zunahme des Kardiomyozyten-Durchmessers.....	126
Abb. 43: Induktion eines Myokardinfarktes resultiert in Abhängigkeit des physischen Aktivitätsstatus in unterschiedlich ausgeprägter Re-Expression fetaler Gene .....	127
Abb. 44: Das Ausmaß der Re-Expression fetaler Gene korreliert positiv mit der Infarktgröße in körperlich inaktiven Mäusen.....	129
Abb. 45: Körperliche Aktivität schützt bei kleinen und mittelgroßen Infarkten vor Re-Expression des fetalen Genprogramms .....	130
Abb. 46: Körperliche Aktivität kehrt tendenziell das infarktinduzierte MHC-Expressionsverhältnis in Richtung der adulten Isoform um .....	131
Abb. 47: Ausdauersport vor und nach Myokardinfarkt reduziert den linksventrikulären Kollagengehalt und die Infarktgröße .....	133
Abb. 48: Induktion eines Myokardinfarktes modifiziert abhängig vom Aktivitätsstatus behandelter Tiere die mRNA-Expression pro-fibrotischer Gene auf unterschiedlich Weise .....	135
Abb. 49: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen zur Aktivierung der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 .....	137
Abb. 50: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Aktivierung von AKT .....	139
Abb. 51: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Aktivierung der P70S6K .....	140
Abb. 52: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Inaktivierung der GSK3 $\beta$ .....	142

---

Abb. 53: Gesamtexpression und Aktivitätsstatus der ERK42/44 unterliegen weitgehend unabhängig vom physischen Aktivitätsstatus der Versuchstiere einer Heraufregulation durch Induktion eines Myokardinfarktes.....	144
Abb. 54: Induktion eines Myokardinfarktes verschiebt das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver ERK44 in Richtung der aktiven Isoform .....	145
Abb. 55: Das Adenosinrezeptor-System unterliegt auf mRNA-Ebene einer Heraufregulation durch Ausdauertraining.....	147
Abb. 56: Der Adenosin-A2a-Rezeptor unterliegt einer Heraufregulation durch Ausdauertraining.....	149
Abb. 57: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 1 .....	164
Abb. 57: Prozentuale Überlebensrate nach Induktion des anterolateralen Myokardinfarktes .....	176
Abb. 58: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 2.....	182

---

Tabelle 1: Primer für semiquantitative PCR-Analysen .....	36
Tabelle 2: Primer für quantitative PCR-Analysen aus Ratten-cDNA .....	36
Tabelle 3: Primer für quantitative PCR-Analysen aus Maus-cDNA .....	36
Tabelle 4: Sonden für quantitative TaqMan <sup>®</sup> PCR-Analysen aus Maus-cDNA .....	37
Tabelle 5: Primärantikörper zur Immundetektion .....	39
Tabelle 6: Sekundärantikörper zur Immundetektion.....	40
Tabelle 7: Primärantikörper zur Immunhistochemie.....	40
Tabelle 8: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper zur Immunhistochemie.....	40
Tabelle 9: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels .....	63
Tabelle 10: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes zur reversen Transkription von Kardiomyozyten-mRNA .....	65
Tabelle 11: Protokoll zur reversen Transkription von Kardiomyozyten-mRNA .....	65
Tabelle 12: Zusammensetzung eines 20 µl RT-Ansatzes zur reversen Transkription von Gewebe-mRNA .....	66
Tabelle 13: Protokoll zur reversen Transkription von Gewebe-mRNA .....	66
Tabelle 14: Zusammensetzung eines 25 µl Ansatzes für semiquantitative PCR-Analysen ...	67
Tabelle 15: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A1-Rezeptor-, A2a-Rezeptor-, A2b-Rezeptor-, A3-Rezeptor-, c-myc- und Gapdh-codierenden Sequenzen.....	67
Tabelle 16: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der β-MHC-codierenden Sequenz .....	67
Tabelle 17: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der α-MHC-codierenden Sequenz .....	68
Tabelle 18: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der c-fos-codierenden Sequenz...68	
Tabelle 19: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes für quantitative PCR-Analysen.....	70
Tabelle 20: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A1-Rezeptor-, A2b-Rezeptor-, α-MHC-, MLC2V- und ANF-codierenden Sequenzen.....	70
Tabelle 21: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A3-Rezeptor-codierenden Sequenz .....	70
Tabelle 22: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A2a-Rezeptor-codierenden Sequenz .....	71
Tabelle 23: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der β-MHC- und Gapdh- codierenden Sequenzen .....	71
Tabelle 24: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes für TaqMan <sup>®</sup> -Analysen .....	72
Tabelle 25: TaqMan <sup>®</sup> -Programm zur quantitativen Amplifikation der TNF-α-, TGF-β-, CTGF-, Kollagen Iα2- und Gapdh-codierenden Sequenzen.....	72
Tabelle 26: Protokoll zur Dehydratation von Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe.....	73
Tabelle 27: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten .....	74

---

Tabelle 28: Färbeprotokoll der Sirius Red-Färbung von Paraffinschnitten .....	76
Tabelle 29: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und/oder des $\alpha$ -Adrenorezeptors bewirkt keine Modulation funktioneller und morphologischer, echokardiographisch determinierter Parameter .....	95
Tabelle 30: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und/oder des $\alpha$ -Adrenorezeptors bewirkt keine Modulation funktioneller und morphologischer, im MRT determinierbarer Parameter .....	96
Tabelle 31: Effekte körperlicher Aktivität vor und nach Induktion eines Myokardinfarktes auf funktionelle und morphologische, echokardiographisch determinierbare Parameter .....	111
Tabelle 32: Veränderungen morphologischer und funktioneller, echokardiographisch determinierbarer Parameter durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen.....	113
Tabelle 33: Effekte körperlicher Aktivität vor und nach Induktion eines Myokardinfarktes auf funktionelle und morphologische, im MRT determinierbare Parameter .....	114
Tabelle 34: Veränderungen morphologischer und funktioneller, im MRT- determinierbarer Parameter durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen.....	116
Tabelle 35: Hämodynamische Effekte einer 4-wöchigen permanenten LAD-Ligatur in Abhängigkeit des physischen Aktivitätsstatus .....	122
Tabelle 36: Hämodynamische Veränderungen, induziert durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen .....	122

---

A	Ampere
A1-/2a-/2b-/3-Rezeptor	Adenosin-A1-/A2a-/A2b-/A3-Rezeptor
AC	Adenylat-Cyclase
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
ANF/ANP	Atrialer/s natriuretischer/s Faktor/Peptid
AngII	AngiotensinII
APS	Ammoniumpersulfat
AT1-Rezeptor	AngiotensinII-Rezeptor Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
AW	“Anterior Wall”, Vorderwand
BNP	“Brain natriuretic peptide”
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
bpm	“Beats per minute”, Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Zyklisches AMP
CD73	5'Ectonukleotidase
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Centimeter
Coll1α2	“Collagen 1α Variant 2”
CPA	N6-Cyclopentyladenosin
CTGF	“Connective tissue growth factor”
DAG	Diacylglycerol
DNA	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	„double strand“, Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
d. h.	das heißt
Echo	Echokardiographie
ECL	“Enhanced Chemoluminescence”

---

EDD	Enddiastolischer Diameter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	„Ejection Fraction“, Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ESD	Endsystolischer Diameter
ET-1	Endothelin-I
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS, FKS	„Fetal Calf Serum“, Fötales Kälberserum
FS	„Fractional Shortening“, Verkürzungsfraktion
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GSK3 $\beta$	Glycogensynthasekinase 3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
HG	Quecksilber
HE	Hämatoxylin-Eosin
HS	„Horseserum“, Pferdeserum
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	Intraperitoneal
ICR	Intercostalraum
Igf-I	„Insulin-like growth factor-I“
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IVS,d/s	Enddiastolisches/Endsystolisches interventrikuläresSeptum
JNK	C-jun terminale Kinase
Kac	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAD	„left anterior descendens artery“, Linke vordere absteigende Koronararterie
LV	Linksventrikulär, linker Ventrikel
m	Meter
M	Molar

---

m-	Milli-
M-	Mega-
MAP(K)	Mitogen-aktivierte Protein (-kinase)
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MLC2v	Ventricular myosin light chain isoform 2
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	„Messenger“-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	„Mammalian target of Rapamycin“
n-	Nano-
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	„Neonatal Calf Serum“, Neonatales Kälberserum
NFκB	„Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NHE-1	Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 1
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PE	Phenylephrin
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PW	„Posterior Wall“, Hinterwand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROS	„Reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	„Rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute

---

RR	„Respiration Rate“, Atemfrequenz
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	„Real-time“-PCR
s	Sekunde
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“, Natriumlaurylsulfat
SSC	„Saline sodium citrat“, NaCl Natriumcitrat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	„Tris buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS-Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	„Transforming growth factor β“
TIMP	„Tissue inhibitor of metalloproetinasen“
TNFα	„Tumor necrosis factor α“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Unit“, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
w/v	„Weight per volume“, Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
α-MHC	„Myosin heavy chain isoform α“
β-MHC	„Myosin heavy chain isoform β“
Δ	Delta, „ohne“
λ	Lambda, Wellenlänge
μ	Micro-
°C	Grad Celsius

# 1 Zusammenfassung

Die Hypertrophie des Herzens als Folge einer chronischen Druck- oder Volumenbelastung, zum Beispiel bei hohem Blutdruck oder nach einem Herzinfarkt, repräsentiert einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Die linksventrikuläre (LV) Hypertrophie wird insbesondere durch eine neurohumorale Aktivierung mediiert, insbesondere durch Stimulation von  $\alpha$ -Adrenorezeptoren (AR) durch erhöhte Adrenalin und Noradrenalin Plasma Konzentrationen. Sie zeichnet sich durch die Kardiomyozyten-Hypertrophie, quantitative und qualitative Modulationen der Gen- und Proteinexpression und der Matrixproteine, sowie durch apoptotische, fibrotische und inflammatorische Ereignisse aus und mündet im maladaptiven LV Remodeling, welches sich in einer LV Dilatation und kardialer Dysfunktion niederschlägt. Eine Reihe von experimentellen und klinischen Studien ergaben widersprüchliche Ergebnisse zu den Effekten von Ausdauertraining auf die maladaptiven Umbauprozesse und die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt. Die Ergebnisse dieser Studien reichen von positiven Effekten über das Fehlen eines Effektes bis hin zu schädigenden Einflüssen von kontinuierlichem Training auf die Myokardhypertrophie und die Pumpfunktion. Erste *in vitro* und *in vivo* Studien suggerierten antihypertrophe und antiinflammatorische Effekte von Adenosin bei  $\alpha_1$ -adrenerg induzierter Hypertrophie *in vitro*. Die genauen Mechanismen, und ob dies auch *in vivo* zutrifft, ist derzeit unvollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnte in *in vitro* und *in vivo* Systemen beobachtet werden, dass der Adenosin-A1-Rezeptor ein effektiver Inhibitor der  $\alpha_1$ -adrenerg induzierten Kardiomyozyten-Hypertrophie, der Fibrose, der Matrixmetalloproteinase 2 und der Bildung oxidativen Stresses – allesamt Charakteristika des maladaptiven Remodelings – ist. Diese Effekte werden nicht durch eine Beeinflussung des adaptiven Phosphoinositol-3-Kinase Signalwegs erklärt. Da die Stimulation des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors, nicht aber des Angiotensin II - oder des Insulin-like growth factor-I-Rezeptors von einer Heraufregulation des Rezeptors *in vitro* und *in vivo* begleitet ist, könnte dies einen negativen Rückkopplungsmechanismus widerspiegeln, über den Adenosin spezifisch der  $\alpha$ -adrenerg induzierten pathologischen Hypertrophie entgegen wirkt. Die vorliegende Arbeit identifiziert somit den Adenosin-A1-Rezeptor als potentiell Ziel neuer Therapieansätze, um den Übergang von der kompensierten

---

Hypertrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz in Folge chronischer Druckbelastung des Herzens zu verhindern.

Weiterhin zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Induktion eines Myokardinfarktes die im physiologisch hypertrophierten Herzen gesteigerte Expression des Adenosinrezeptor-Systems, insbesondere des Adenosin-A<sub>2a</sub>-Rezeptors, inhibiert und unterstützen somit die Hypothese, dass das Adenosin-System an der Aufrechterhaltung des kompensierten Zustandes des hypertrophierten Herzens beteiligt ist. Diese Arbeit liefert keine Hinweise auf schädigende Effekte von vor und nach anterolateralem Myokardinfarkt durchgeführten Ausdauersports auf die kardiale Funktion oder die adaptive Kardiomyozyten-Hypertrophie, sondern bestätigt vielmehr dessen kardioprotektive Wirkung auf den maladapten Remodeling-Prozess. So führt vor und früh nach Infarkt durchgeführtes Lauftraining zur Abschwächung der infarktinduzierten LV Fibrose, der Infarktexpansion und der Narbenausdünnung, vermutlich durch Hemmung des inflammatorischen Zytokins Tumor necrosis factor  $\alpha$  und Regulation der Matrixmetalloproteinase 9, und wirkt der Reaktivierung fetaler Gene entgegen. Diese positiven Effekte werden unabhängig vom Adenosin-System, des adaptiven Phosphoinositol-3-Kinase Signalwegs und der extrazellulär regulierten Kinase vermittelt. Diese Ergebnisse legen die kontinuierliche Durchführung von Ausdauertraining, als kostengünstige und effektive Therapieform, nahe, um den Progress in eine Herzinsuffizienz durch Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität und Architektur positiv zu beeinflussen.

## 1 Summary

Myocardial pathological hypertrophy, as a consequence of chronic pressure- or volume-overload, such as subsequent to myocardial infarction or due to hypertension, represents an independent risk factor for the development of heart failure. Left ventricular hypertrophy is mediated especially by neurohumoral activation, due to  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation by increased plasma concentrations of adrenaline and noradrenaline. It is characterized by cardiomyocyte-hypertrophy, quantitative and qualitative modulations in gene- and protein-expression and in matrix proteins, as well as by apoptotic, fibrotic and inflammatory events and leads to maladaptive left ventricular remodeling, including ventricular dilatation and cardiac dysfunction. Various studies in animal models and in human patients yielded conflicting results concerning the effect of endurance training on left ventricular remodeling and function, including beneficial, neutral and adverse effects. Previous *in vitro* studies revealed anti-hypertrophic and anti-inflammatory effects of adenosine in response to  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation, however, the exact mechanisms and whether these effects occurs also *in vivo*, are incompletely resolved.

Using a wide array of *in vitro* and *in vivo* experiments, the present study reveals that stimulation of adenosine-A1-receptor efficiently counteracts  $\alpha$ -adrenergic induced cardiomyocyte-hypertrophy, fibrosis, activation of matrix metalloproteinase 2 and the generation of oxidative stress – all hallmarks of pathological hypertrophy. These beneficial effects are not mediated by an activation of the adaptive phosphoinositol-3-kinase pathway. Since stimulation of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor is accompanied by an up-regulation of the adenosine-A1-receptor *in vitro* and *in vivo*, while stimulation of the angiotensin II- or the insulin-like growth factor I-receptor has no such effect, this may resemble a specific negative feed-back mechanism, by which adenosine specifically counteracts  $\alpha$ -adrenergic induced pathological hypertrophy. Thus, the present study identifies the adenosine-A1-receptor as a potential target for new therapeutic strategies to prevent transition from compensated myocardial hypertrophy to decompensated heart failure due to chronic cardiac pressure-overload.

Furthermore, the data of the present study indicate that induction of myocardial infarction inhibits increased expression of the adenosine-receptor-system, especially of the adenosine-A2a-receptor, in the physiologically hypertrophied heart, supporting

---

the concept that adenosine may maintain cardiac function and prevent the development of heart failure. The results indicate that endurance training provides beneficial (and not harmful) effects on cardiac remodeling. In particular, exercise, performed prior to and early after myocardial infarction attenuates infarction-induced fibrosis, expansion of the infarction area and scar thinning, presumably by inhibition of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  and via regulation of matrix metalloproteinase 9, and counteracts the reactivation of fetal genes. These beneficial effects are mediated independently from the adenosine-system, the adaptive phosphoinositol-3-kinase pathway and the extracellular regulated kinase. The present study supports the concept that endurance training is an effective and cost-efficient therapy to improve long-term outcome of patients after myocardial infarction by maintaining cardiac contractility and architecture.

## 2 Einleitung

### 2.1 Hypertrophie

Das Herz setzt sich hauptsächlich aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Mastzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und der umgebenden extrazellulären Matrix zusammen. Man vermutet, dass Kardiomyozyten, welche zwischen 70 und 80% der myokardialen Masse ausmachen, bei oder unmittelbar nach der Geburt ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren. Postnatal ist ein Wachstum der Herzmuskelzellen vorrangig Resultat einer Größenzunahme. Im adulten Säugetier ist die Herzmasse mit der funktionellen Belastung verknüpft. An erhöhte systolische oder diastolische Belastungen adaptiert sich der linke Ventrikel, indem eine Größenzunahme der Kardiomyozyten und eine erhöhte Sarkomerorganisation induziert wird – die hypertrophe Antwort, um so Wandspannung und kardiale Pumpfunktion aufrecht zu erhalten (Frey et al., 2004).

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten der Hypertrophie. Die pathologische Hypertrophie, meist Folge einer chronischen Druck- (z. B. Bluthochdruck, Aortenstenose) oder Volumenbelastung (z. B. in Folge einer Herzklappeninsuffizienz), repräsentiert einen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz inklusive kardialer Dysfunktion, aber auch für maligne Herzrhythmusstörungen und zerebrovaskuläre Ereignisse und ist normalerweise nicht oder gering reversibel. Die physiologische Hypertrophie findet während der postnatalen Entwicklung statt und wird in Athleten durch eine Ausdauersport-induzierte Volumenbelastung oder durch eine Krafttraining-vermittelte Druckbelastung ausgelöst und ist gewöhnlich reversibel.

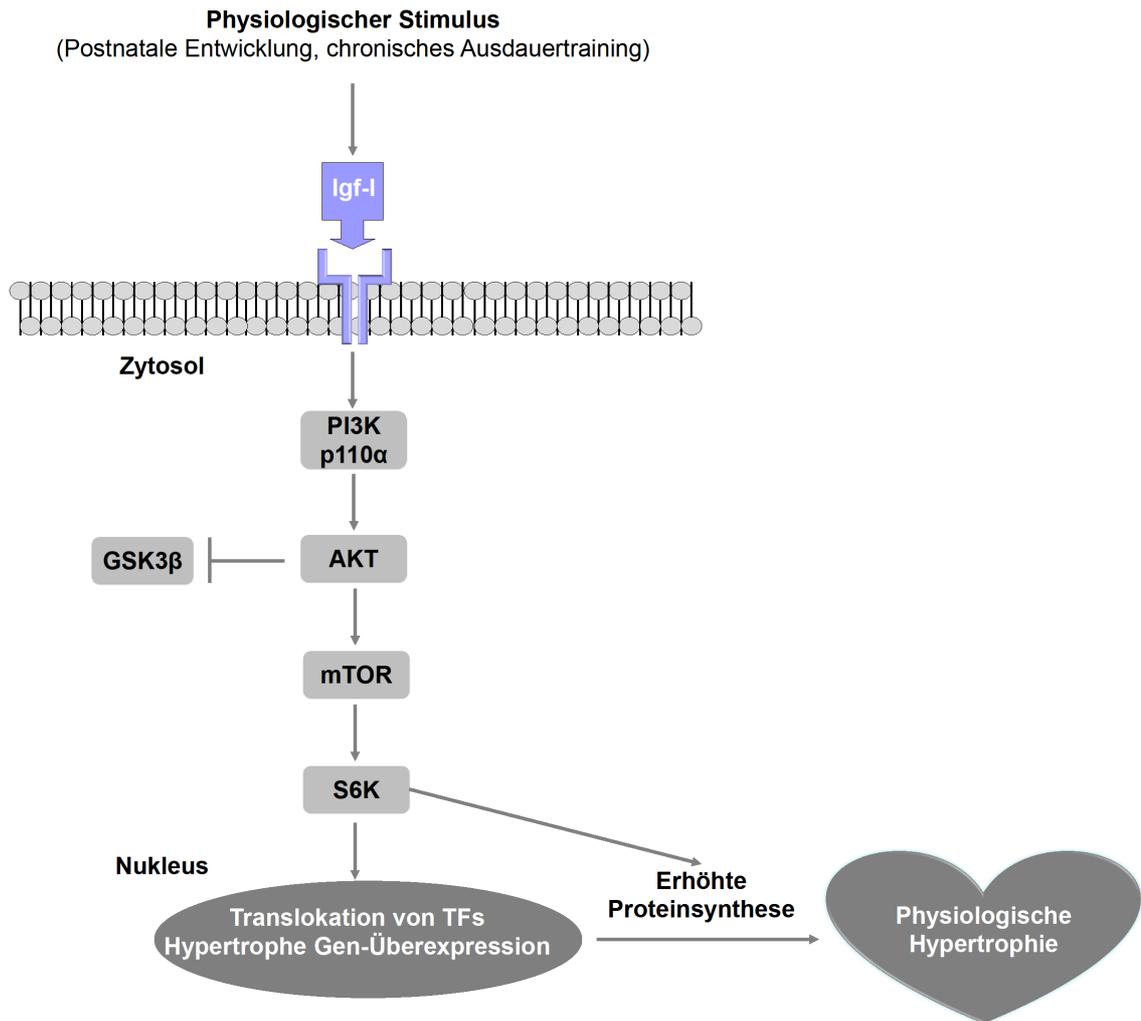
### 2.2 Die physiologische Hypertrophie

Es ist bereits seit Jahrzehnten bekannt, dass Ausdauersport zur Ausbildung einer adaptiven, exzentrischen Hypertrophie führt. Signalwege, die diese Form der Hypertrophie des Herzens induzieren, führen zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße, der Sarkomere und der Myokardmasse. Die physiologische Hypertrophie ist im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie in der Regel weder mit systolischer oder diastolischer Dysfunktion noch mit kardialer Fibrose assoziiert (Morganroth et al., 1975) und mündet insbesondere nicht in einer Herzinsuffizienz (McMullen und Jennings, 2007). Ausdauertraining führt viel eher zu erhöhter myokardialer Perfusi-

onkapazität und ist mit einer Aufrechterhaltung oder sogar einer Verbesserung der kardialen Funktion assoziiert (Moore und Korzick, 1995). Aufgrund der dokumentierten günstigen Effekte, die Ausdauersport und folglich die Induktion einer physiologisch hypertrophen Antwort auslöst, kann spekuliert werden, dass nicht die Hypertrophie per se, die durch Reduktion der Wandspannung pathophysiologisch eher günstig wäre, die ungünstige Prognose von Patienten mit pathologischer Hypertrophie begründet. Möglicherweise wäre es sogar prognostisch erstrebenswert, adaptive Hypertrophie-Mechanismen nicht zu inhibieren, sondern diese gezielt zu aktivieren.

### **2.2.1 Signaltransduktion zur Induktion der physiologischen Hypertrophie**

Mittlerweile manifestiert sich die Hypothese, dass für die Ausprägung physiologischer Hypertrophie ein Signalweg verantwortlich ist, der Igf-I (Insulin-like growth factor), die PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) p110 $\alpha$ , AKT (Proteinkinase B) und mTOR (Mammalian target of Rapamycin) involviert (siehe Abb.1). Diese Vermutung wird zum Einen dadurch gestützt, dass Ausdauertraining zur vermehrten systemischen und lokalen Sekretion von Wachstumshormonen wie Igf-I im Herzen führt (Dorn und Force, 2005; McMullen et al., 2004b; Walsh, 2006). Zum Anderen wurde gezeigt, dass eine Überexpression des Igf-I-Rezeptors oder der aktivierten Form von AKT und gesteigerte Igf-I/PI3Kp110 $\alpha$ -Signaltransduktion eine myokardiale Hypertrophie mit normaler oder verbesserter kardialer Funktion auslöst (Latronico et al., 2004; McMullen et al., 2004b; Shioi et al., 2000). Die Beobachtung, dass transgene Mäuse mit einem unterdrückten Igf-I/PI3K/AKT-Signalweg in Folge von Ausdauertraining keine Anzeichen einer Hypertrophie aufweisen (DeBosch et al., 2006; McMullen et al., 2003), lässt den Schluss zu, dass eine Aktivierung dieses Signalwegs essentiell für die Induktion der adaptiven physiologischen Hypertrophie ist. Die AKT-abhängige Zunahme der Proteinsyntheserate und die daraus resultierende hypertrophe Antwort stellt eine Konsequenz der mTOR-Aktivierung dar. Allerdings wurde bereits auch gezeigt, dass eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin die durch maladaptive Druckbelastung induzierte Zunahme der Kardiomyozytengröße abschwächt (McMullen et al., 2004a; Wullschleger et al., 2006). Neben der Aktivierung von mTOR ist weiterhin die AKT-vermittelte Inhibition der GSK3 $\beta$  (Glycogensynthasekinase 3  $\beta$ ), die in ihrem aktiven Zustand als negativer Regulator der Hypertrophie agiert, für die Induktion der hypertrophen Antwort erforderlich (Haq et al., 2000).



**Abb. 1: Signaltransduktion zur Induktion der physiologischen Hypertrophie**

Physiologische Stimulation, wie das postnatale Wachstum und chronisches Ausdauertraining, führt zur vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren wie Igf-I. Igf-I agiert über seinen Igf-I-Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase, welche über Ras die PI3Kp110 $\alpha$  aktiviert. Die aktivierte Kinase phosphoryliert/aktiviert die Proteinkinase AKT, welche die GSK3 $\beta$  inaktiviert und mTOR-abhängig die S6K phosphoryliert. Dies führt zur gesteigerten Proteinbiosyntheserate und zur Translokation von Transkriptionsfaktoren (TFs), die im Kern die Transkription von Genen anschalten, die das Wachstum der Kardiomyozyten initiieren, was schließlich zur Induktion des physiologisch hypertrophen Phänotyps des Herzens führt. Igf-I=Insulin-like growth factor, PI3K=Phosphoinositol-3 Kinase, mTOR=Mammalian target of Rapamycin, S6K=Ribosomale S6 Kinase, GSK3 $\beta$ =Glycogensynthasekinase 3 $\beta$

## 2.3 Die pathologische Hypertrophie

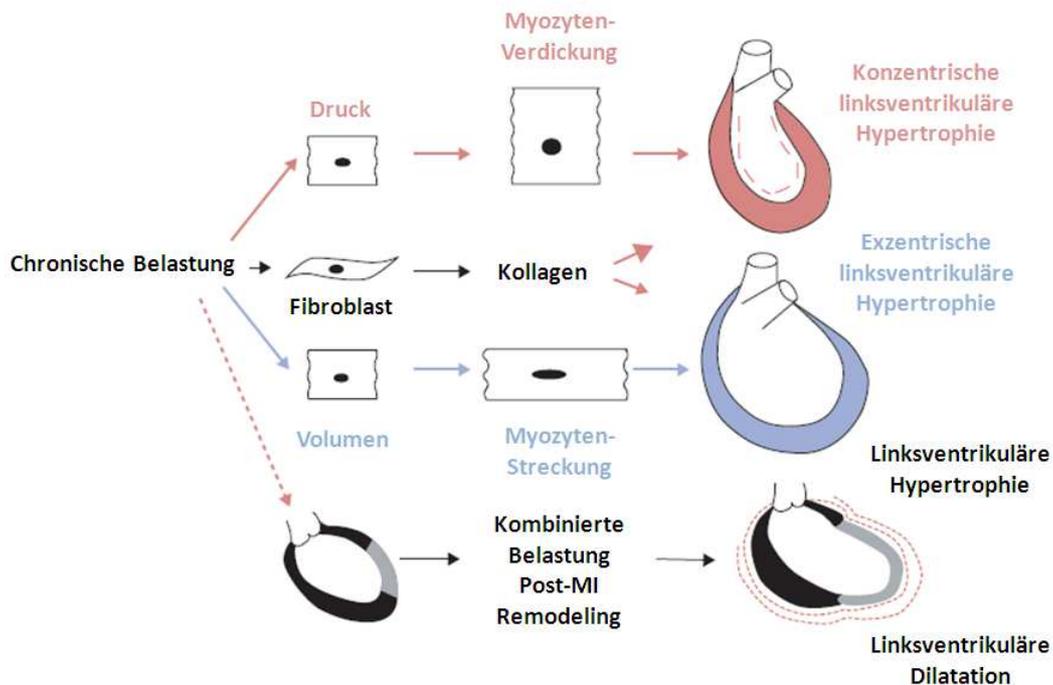
Die pathologische Hypertrophie ist meist das Resultat anhaltender Druck- und Volumenbelastungen, biochemischen Stresses, inflammatorischer Signale und der Aktivierung endokriner Hormonsysteme, insbesondere des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), sowie des Vasokonstriktion-

tors Endothelin-I (ET-1) oder kardialer Schäden, z. B. ausgelöst durch einen Myokardinfarkt. Die genannten pathologischen Stimuli führen zu inadäquat erhöhter Wandspannung und induzieren eine Hypertrophie, die sich nicht nur durch Zunahme der Myokardmasse und der Kardiomyozytengröße, sondern durch diverse strukturelle, biochemische und elektrophysiologische Umbauvorgänge auszeichnet. Diese als Remodeling bezeichneten Umbauprozesse stellen initial eine adaptive Antwort mit dem Ziel der Aufrechterhaltung der normalen kardialen Funktion und der myokardialen Geometrie dar. Das Remodeling zielt also zunächst darauf ab, hämodynamische Kompensation zu verschaffen, wird jedoch bei fortwährender chronischer Belastung graduell maladaptiver und resultiert schließlich in ventrikulärer Dilatation, Fibrose und progressiver kontraktile Dysfunktion, was sich klinisch durch das Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz manifestiert (Frey und Olson, 2003; McMullen und Jennings, 2007; Opie et al., 2006). Das kardiovaskuläre Risiko korreliert hierbei mit der Zunahme der myokardialen Masse. Demzufolge ist es von immenser Bedeutung die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die dem Übergang der adaptiven Hypertrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz entgegen wirken, um effiziente Therapieansätze zu entwickeln.

### **2.3.1 Modulation der kardialen Geometrie im Zuge des Remodelings**

Erhöhte systolische Wandspannung, als Konsequenz einer chronischen Druckbelastung, resultiert in einer konzentrischen Hypertrophie, d. h. einer Zunahme von Kardiomyozyten-Durchmesser und –Querschnittsfläche. Dies wiederum mündet in einer Verdickung linksventrikulärer Wände und der Durchmesserzunahme des linken Ventrikels. Erhöhte diastolische Wandspannung, als Folge chronischer Volumenbelastung, induziert eine exzentrische Hypertrophie, die durch eine Streckung der Kardiomyozyten, also eine Zunahme der Querschnittsfläche, und die daraus resultierende Kavitätsvergrößerung des linken Ventrikels charakterisiert ist, der keine (oder eine nur geringe) Wandverdickung gegenüber steht. Der linksventrikuläre Remodeling-Prozess in Folge eines Myokardinfarktes stellt eine Kombination aus exzentrischer und konzentrischer Hypertrophie dar. Er setzt sich somit aus der Kardiomyozyten-Hypertrophie, geometrischen Veränderungen linksventrikulärer Wände, dem Verlust von Kardiomyozyten, der Kollagen-Akkumulation, einer Ausdehnung des Infarkt-areals und der linksventrikulären Dilatation zusammen. Nach einem Myokardinfarkt durchläuft folglich nicht nur das infarzierte, sondern auch das nicht-infarzierte Areal

komplexe architektonische Veränderungen. Das Ausmaß des Remodelings bestimmt über die verbleibende Leistungsfähigkeit und Funktion des linken Ventrikels.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Morphologie der pathologischen konzentrischen und exzentrischen Hypertrophie und des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt**

Pathologische chronische Druckbelastung des Herzens (rot) führt zur Verdickung der Kardiomyozyten und resultiert in der konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels, die durch relativ kleine Kavitäten und eine Verdickung der Wände gekennzeichnet ist. Chronische Volumenbelastung (blau) induziert eine Streckung der Herzmuskelzellen und erzeugt so einen dilatierten linken Ventrikel mit relativ dünnen Wänden, was als linksventrikuläre exzentrische Hypertrophie bezeichnet wird. Beide Hypertrophiearten sind durch Fibrose via Kollagensynthese der Fibroblasten gekennzeichnet. Durch einen Myokardinfarkt entsteht eine Kombination aus Druck- und Volumenbelastung im Herzen, was eine linksventrikuläre Hypertrophie mit einer Verdickung der Wände im nicht-infarzierten Areal und eine Dilatation mit einer Ausdünnung der infarzierten Wandbereiche zur Folge hat (Modifiziert nach Opie et al., 2006). MI=Myokardinfarkt

### 2.3.1.1 Effektoren der geometrischen Modulation im Zuge des Remodelings

Beim progressiven Remodeling spielen Kardiomyozyten und Fibroblasten, sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) bzw. quantitative und qualitative Veränderungen des Kollagengehalts und des fibrillären Kollagennetzwerks eine bedeutende Rolle. Unabhängig vom kausalen Faktor scheint der Remodeling-Prozess aus drei unterschiedlichen Phasen zu bestehen. In der initialen Phase wird das fibrilläre Kollagen teilweise degradiert, was unter anderem auf erhöhte Aktivität der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zurückzuführen ist (Gunasinghe et al., 2001; Mott und Werb, 2004; Spinale,

2007). In der zweiten, kompensatorischen Phase gehen MMP-Aktivität und Kollagengehalt auf das Ausgangsniveau zurück, während die Kardiomyozyten-Hypertrophie progressiv fortschreitet. Die finale Phase ist erreicht, wenn die kompensatorischen Mechanismen erschöpft sind und eine erhöhte MMP-Aktivität, eine deutliche ventrikuläre Dilatation und ausgeprägte Fibrose in Erscheinung treten.

#### **2.3.1.1.1 Kollagene**

Die EZM, die von den kardialen Fibroblasten synthetisiert wird, hält normalerweise durch die hochorganisierte Struktur der Matrixproteine die myokardiale Architektur aufrecht und trägt zur linksventrikulären Pumpfunktion durch Koordination der Myozytenverkürzung bei. Die vorrangigen Strukturproteine der EZM sind die fibrillären Kollagene Typ I und III, die als Pro-Kollagene gebildet und im extrazellulären Milieu posttranslational modifiziert werden, bevor sie in die EZM inkorporiert werden. Der Grad der Steifigkeit im Myokard wird vorrangig durch Kollagene des Typs I determiniert. Im gesunden Herzen liegt eine sehr niedrige Synthese- und Abbaurate der Kollagene vor. Während pathologischen Situationen werden jedoch Kollagensynthese und -abbau beschleunigt. Die erhöhte Kollagensynthese der Fibroblasten, die z.B. durch TGF $\beta$  (Transforming growth factor), CTGF (Connective tissue growth factor), RAAS-, MMP-2- und NOX (NADPH-Oxidase)-Aktivierung induziert wird, mündet in der Verdickung (nicht-infarzierter) linksventrikulärer Wände und der kardialen Fibrose (Hein et al., 2003; Ikeuchi et al., 2004; Kuwahara et al., 2004; Wang et al., 2010). Die Akkumulation fibrillärer Kollagene im extrazellulären Raum und/oder die gesteigerte Vernetzung der Kollagene ist dann nicht nur für den Verlust der Flexibilität, sondern auch für die Zerstörung elektrischer und mechanischer Eigenschaften des Herzens verantwortlich, was in der ventrikulären Dysfunktion mündet (Brower et al., 2006).

#### **2.3.1.1.2 Matrixmetalloproteinasen**

Matrixmetalloproteinasen, eine Familie Zink-abhängiger Endoproteinasen, kommt eine Reihe biologischer Funktionen zu, wie die Beteiligung an der normalen embryonalen Entwicklung, an der Wundheilung und an pathologischen Prozessen (Visse und Nagase, 2003). MMPs werden von Fibroblasten, Endothelzellen und Myozyten, sowie, unter inflammatorischer Stimulation, von Mastzellen, Makrophagen und Neutrophilen im Herzen als inaktive Zymogene produziert und in den extrazellulären Raum sezerniert (Cleutjens et al., 1995). Mechanischer Stress, bioaktive Moleküle,

wie AngII, ET-1 und Noradrenalin, sowie Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies initiieren die Expression, Sekretion und Aktivierung der MMPs (Spinale, 2007). Unter normalen Umständen unterliegt die MMP-Aktivität einer strengen Kontrolle durch die endogenen „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMPs; Creemers et al., 2003). Bei der chronischen Herzinsuffizienz scheint ein Ungleichgewicht zwischen MMP- und TIMP-Aktivität für die erhöhte MMP-Aktivität und die Ruptur des myokardialen Matrix-Kollagens verantwortlich zu sein (Jayasankar et al., 2004; Spinale et al., 1998). Tierstudien zeigten, dass das Ausmaß des Remodelings nach Myokardinfarkt durch Inhibition der MMPs abgeschwächt werden kann und bestätigen somit eine zentrale Bedeutung der MMPs bei den chronischen Umbauprozessen des Herzens (Mukherjee et al., 2003; Rohde et al., 1999). In der frühen Wundheilungsphase innerhalb der ersten sieben Tage nach Infarkt werden die MMPs vermehrt exprimiert und aktiviert. Aktivierte MMPs vermitteln dann die EZM-Degeneration und die Ruptur des fibrillären Kollagenetzwerks. Dies wiederum ermöglicht, dass inflammatorische Zellen in das Infarktareal einwandern, nekrotische Kardiomyozyten entfernen und MMPs, Zytokine, Wachstumsinitiatoren und angiogene Faktoren freisetzen (Vanhoutte et al., 2006). Die Framingham-Studie demonstrierte, dass nach Myokardinfarkt vorrangig die Konzentration der MMP-9 deutlich erhöht ist (Sundstrom et al., 2004), und Wagner und Kollegen identifizierten die MMP-9 als Risikomarker für die Entwicklung des linksventrikulären Remodelings und der Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt (Wagner et al., 2006). In der Maus exprimieren die infiltrierenden Neutrophile und Makrophagen bereits innerhalb von 24 Stunden die aktive MMP-9 im Infarktareal. Ab Tag 3 ist diese Aktivierung auch im nicht-infarzierten Bereich zu detektieren und ist weiterhin von einer Aktivierung der MMP-2 begleitet. Charakteristisch für den frühen Umbauprozess nach Myokardinfarkt ist die Ausbreitung des infarzierten Areals, als Konsequenz der MMP-vermittelten EZM-Degradation (Creemers et al., 2001). Die frühe Remodeling-Phase, etwa 7-21 Tage nach Myokardinfarkt, ist durch die Phagozytose des nekrotischen Myokards, die Migration und die Proliferation von (Myo)Fibroblasten und Endothelzellen gekennzeichnet. Infiltrierende Fibroblasten synthetisieren eine desorganisierte EZM, um ein Narbengewebe zu bilden, und Endothelzellen initiieren die Neoangiogenese, während die Kardiomyozyten-Hypertrophie im nicht-infarzierten Areal progressiv fortschreitet (Vanhoutte et al., 2006). In der späten Remodeling-Phase (ab dem 21. Tag nach Infarkt) resultiert die MMP-vermittelte Degeneration der Kollagenvernetzung in der linksventrikulä-

ren Dilatation und zerstört somit die ursprüngliche Rahmenstruktur des Ventrikels (Bradham et al., 2002). Dies könnte wiederum zur weiteren Degeneration beitragen, durch Mechanismen die Apoptose, oxidativen Stress und neurohumorale Aktivierung involvieren (Cheng et al., 1995). Die Prävention exzessiver Gewebedegeneration durch strenge Kontrolle der MMP-Aktivität repräsentiert folglich einen molekularen Mechanismus, der intensiver Forschung bedarf, um Therapieansätze aufzudecken, die den ventrikulären Remodeling-Prozess in Folge pathologischer Stimulation eindämmen könnten.

### **2.3.2 Modulation der Gen-Expression im Zuge des Remodelings**

Die Hypertrophie ist auf zellulärer Ebene von quantitativen und qualitativen Veränderungen der Expression von Genen gekennzeichnet, die an der Induktion der Hypertrophie beteiligt sind, bzw. durch Herabregulation von Genen, die dieser kardialen Antwort entgegen wirken.

#### **2.3.2.1 „Early response“ Gene**

In Folge mechanischer und humoraler Stimuli wird als erste zelluläre Antwort eine Gruppe von Genen, die als „early response“ oder „immediate early“ Gene bezeichnet werden, angeschaltet (Ruwhof und van der Laarse, 2000). Zu diesen Genen zählen die Proto-Onkogene c-fos, c-myc und c-jun und die „Heat shock protein“ Gene, die bereits innerhalb von 30 Minuten nach Eingang des maladaptiven Stimulus eine transkriptionelle Heraufregulation erfahren, nach einer Stunde ihr Expressionsmaximum erreichen und schließlich als Transkriptionsfaktoren die Expression von Effektorproteinen initiieren (Usui et al., 2006).

#### **2.3.2.2 Fetale Gene**

Ein weiteres molekulares Merkmal der pathologischen Myokardhypertrophie ist die Re-Expression fetaler, im Laufe der Entwicklung des Herzens herab regulierter Gene, deren Produkte die kardiale Kontraktilität und das Calcium-Handling regulieren (Beisvag et al., 2009). So erfolgt bei hämodynamischer Belastung die Reaktivierung von BNP (Natriuretisches Peptid Typ B) und ANF/ANP (Atrialer/s natriuretischer/s Faktor/Peptid), dessen Expression kurz nach der Geburt auf die Vorhöfe beschränkt ist und im Zuge der hypertrophen Antwort im Ventrikel reaktiviert wird, die Expressionsinduktion des sarkomerischen Gens MLC2V (Ventricular Myosin Light Chain iso-

form 2), eine Verschiebung des kardialen  $\alpha$ -Aktins zum fetalen skeletalen  $\alpha$ -Aktin und von der adulten MHC-Isoform  $\alpha$ -MHC (Myosin Heavy Chain isoform  $\alpha$ ) zum fetalen  $\beta$ -MHC (Myosin Heavy Chain isoform  $\beta$ ). Die adulte MHC-Isoform weist eine dreifach höhere ATPase-Aktivität als die fetale Isoform auf. Die Kapazität der ATP-Hydrolyse des Myosinmoleküls korreliert mit der Verkürzungsgeschwindigkeit des Herzmuskels. Die Verschiebung der MHC-Expression in Richtung des fetalen Gens trägt somit zur verringerten Kontraktilität und folglich zur ventrikulären Dysfunktion bei (Carreno et al., 2006). Eine gezielte Umkehrung des Expressions-Shifts zu Gunsten der adulten MHC-Isoform bzw. eine Hemmung der Reaktivierung fetaler Gene in Folge maladaptiver Stimulation könnte folglich prognostisch günstige Effekte auf das Fortschreiten der Herzinsuffizienz ausüben.

### **2.3.3 Induktoren der pathologischen Hypertrophie**

Die Pathologie der kardialen Hypertrophie ist neben den beschriebenen morphologischen Umbauprozessen des Ventrikels, der Fibrose und den qualitativen und quantitativen Veränderungen in Gen- und Proteinexpression weiterhin durch die neurohumorale Hyperaktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, sowie durch erhöhten oxidativen Stress und inflammatorische Signalwege im Herzen gekennzeichnet. Eine grundlegende Hypothese ist, dass die Art des hypertrophen Stimulus, das Ausmaß der Stimulation und die durch diese angeschalteten Signalwege darüber entscheiden, ob eine adaptive oder maladaptive Hypertrophie ausgelöst wird. Das heißt, dass Kardiomyozyten, abhängig vom eingehenden Stimulus, überleben und eine adaptive Hypertrophie durchlaufen (Sugden, 2001) oder apoptotisch werden, was wiederum zur linksventrikulären Dilatation und zum Herzversagen führt (Baines und Molkentin, 2005).

#### **2.3.3.1 Oxidativer Stress**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können adaptive Antworten auslösen, sofern eine moderate Bildungsrate vorliegt, führen jedoch zum ventrikulären Remodeling inklusive kontraktiler Dysfunktion, Fibrose und Apoptose, wenn sie in hohem Maß gebildet werden (Bradham et al., 2002; Sawyer et al., 2002). Eine Behandlung mit Antioxidantien resultiert in der Eindämmung kardialer Hypertrophie durch Inhibition der Fibrose (Olson et al., 2005; Sutra et al., 2008), inflammatorischer Antworten und ROS-abhängiger pro-hypertropher Signaltransduktion im Hochdruckmodell (Cai et al.,

2009; Shen et al., 2010). Bei chronischer Volumenbelastung bewirken Antioxidantien eine Reduktion des oxidativen Stresses und zirkulierender ET-1-Level, unterbinden die MMP-2- und -9-Aktivierung und den Zusammenbruch des ventrikulären Kollagens (Cingolani et al., 2006) in der frühen Remodeling-Phase (Gardner et al., 2010). Klinische Studien demonstrierten bereits vor einigen Jahren, dass Patienten mit chronischer systolischer Dysfunktion erhöhte Biomarker für oxidativen Stress aufweisen und, dass der Gehalt dieser Marker mit dem Schweregrad des Krankheitsbildes korreliert (Keith et al., 1998; Mallat et al., 1998). Induktoren der ROS-Bildung sind z. B. mechanische Spannung, Wachstumsinitiatoren, wie AngII, Aldosteron, ET-1 und  $\alpha$ -adrenerge Agonisten, sowie das inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Cingolani et al., 2006; Kimura et al., 2005a; Kuster et al., 2005; Maack et al., 2003). Die Stimulation G $\alpha$ q/-gekoppelter Rezeptoren (ET-1-, AT1-,  $\alpha$ -Adrenorezeptor) aktiviert die PKC (Proteinkinase C), die wiederum NADPH-Oxidase-abhängige (Ide et al., 1999; Maack et al., 2003) und mitochondriale ROS-Produktion auslösen kann, was im Remodeling-Prozess mündet. Die beschriebenen Effekte weisen letztlich darauf hin, dass eine Hemmung oxidativen Stresses zur Aufrechterhaltung der kompensierten Hypertrophie in Folge maladaptiver Stimulation beitragen und somit dem Übergang in die dekompenzierte Herzinsuffizienz entgegen wirken könnte.

### 2.3.3.2 Inflammatorische Signale

Inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und die Interleukine 1, 6 und 18 erfahren im Zuge der hypertrophen Antwort eine Heraufregulation (Anker und von Haehling, 2004; Balakumar und Singh, 2006). TNF $\alpha$  wird von Kardiomyozyten in Folge einer Vielzahl von Stimuli, wie Lipopolysacchariden, Druckbelastung und oxidativem Stress, NF $\kappa$ B-abhängig exprimiert und kann autokrin seinen Rezeptor aktivieren, was in der hypertrophen Antwort mündet (Henriksen und Newby, 2003). So scheint TNF $\alpha$  auch bei der AngII-vermittelten chronischen Kardiomyozyten-Hypertrophie eine mechanistische Rolle zu spielen (Sriramula et al., 2008). Dem pro-apoptotischen Zytokin kommt eine wesentliche Bedeutung beim progressiven myokardialen Remodeling zu (Ono et al., 1998). So resultierten Behandlungen mit TNF $\alpha$  *in vitro* und *in vivo* bzw. Überexpressionen des Zytokins in der Expressionszunahme der MMP-2 und -9 (Bozkurt et al., 1998; Siwik et al., 2000) und in der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und einer Herzinsuffizienz (Bryant et al., 1998; Kubota et al., 1997).

Zytokine wie TNF $\alpha$  scheinen jedoch in niedrigen Konzentrationen protektiv und nur in hohen Konzentrationen maladaptiv zu wirken (Mann, 2003).

### **2.3.3.3 Neurohumorale Aktivierung**

Die durch Druckbelastung induzierte frühe adrenerge Aktivierung des RAAS und des Vasokonstriktors ET-1, gefolgt von einer enorm gesteigerten allgemeinen sympathischen Aktivierung, resultiert in der kardialen Hypertrophie, den strukturellen Schäden, der Fibrose und weiterhin in permanent erhöhten Konzentrationen an Katecholaminen, Renin, AngII und Aldosteron (Molkentin und Dorn, 2001) und könnte den Übergang von der kompensierten Hypertrophie zur dekompensierten Herzinsuffizienz initiieren. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Induktion der adrenergen Signaltransduktion die Aktivierung der MMP-2 nach sich zieht (Banfi et al., 2005). Die chronische Aktivierung kardialer  $\beta_1$ -Adrenozeptoren führt zum maladaptiven kardialen Remodeling durch Induktion von Hypertrophie, Apoptose und Fibrose (Engelhardt et al., 1999). Die Apoptose-Induktion erfolgt hierbei durch PKA-abhängige (Communal et al., 1998) und PKA-unabhängige Signalwege (Zhu et al., 2003). Die Heraufregulation der G-Protein gekoppelten Rezeptor Kinase 2 (GRK2; Synonym  $\beta$ ARK1) spielt eine wichtige Rolle zum Einen bei der Entkopplung kardialer  $\beta$ -Adrenorezeptoren, zum Andern bei der Dysregulation der kardiomyozytären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase (Maack, 2012; Raake et al., 2012). Die Herabregulation kardialer  $\beta$ -Adrenorezeptoren ist jedoch wahrscheinlich nicht der eigentliche Auslöser des kardialen Remodelings, sondern eher Ausdruck der chronischen sympathischen Aktivierung (Maack, 2012). Zusätzlich vermittelt AngII die Expression des pro-fibrotischen Faktors TGF $\beta$  (Peng et al., 2005; Wenzel et al., 2001) und die Freisetzung von Aldosteron, was wiederum die Induktion kardialer Fibrose unterstützt. Die Kombination aus Apoptose und Fibrose resultiert letztendlich in der Desorganisation und der verringerten Kontraktilität des linken Ventrikels.

### **2.3.4 Signaltransduktion zur Induktion der pathologischen Hypertrophie**

Die myokardiale Hypertrophie wird über Aktivierung von Mechanorezeptoren bzw. neuroendokrin durch systemisch und/oder lokal freigesetzte Neurotransmitter, vasoaktive Peptide und inflammatorische Zytokine induziert. Diese binden an spezifische, membranständige Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren), über die sie ein komplexes

Signaltransduktionsnetzwerk aktivieren. Mittlerweile wurde einer großen Anzahl intrazellulärer Signaltransduktionswege eine wesentliche Bedeutung bei der Regulation hypertropher Antworten zugeschrieben. Diese Signalwege umfassen z. B. solche, die spezifische G-Proteine, kleine GTPasen (Ras, Rho, Rac), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die Proteinkinase B (AKT) und C, Januskinasen, Calcineurin, HDACs (Histondeacetylasen) der Klasse I, TRPCs (Transient receptor potential channels), Integrine, Caspase-3, TNF $\alpha$ , Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, TGF $\beta$  und Igf-I involvieren. Die Signalwege übertragen die extrazellulären Signale an den Nukleus, um ein Kollektiv verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z. B. GATA-4, NF $\kappa$ B, MEF-2, ATF-2 und STAT zu aktivieren, welche schließlich die Genexpression regulieren (Balakumar und Jagadeesh, 2010; Molkenin und Dorn, 2001). Die verschiedenen Signalwege sind kaskadenartig angeordnet und unterliegen einer wechselseitigen Beeinflussung. Der netzartige Aufbau ermöglicht eine komplexe Regulation und gegebenenfalls eine Potenzierung der eingehenden Signale.

#### **2.3.4.1 Endokrine Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

Die Aktivierung der endokrinen Hormonsysteme führt über Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren die kardiomyozytären Umbauprozesse herbei. Heterotrimere GTP-bindende Proteine übertragen stimulatorische oder inhibitorische Signale ligandengebundener 7-Transmembran-Rezeptoren. Alle heterotrimeren G-Proteine bestehen aus separaten G $\alpha$ - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Der Agonismus des membrangebundenen Rezeptors katalysiert den Austausch von GDP durch GTP und initiiert so die Dissoziation der G $\alpha$ -Untereinheit von G $\beta\gamma$ . Beide Untereinheiten können nachfolgend die Aktivität von down-stream Effektoren des angeschalteten Signalwegs modulieren. Die G $\alpha$ -Proteine unterteilt man im kardiovaskulären System, abhängig von ihren hämodynamischen und chronisch myotropen Effekten, in 3 Klassen: Gas, Gai und Gaq. Gas ist z. B. an  $\beta$ -Adrenorezeptoren gekoppelt, wird durch Adrenalin und Noradrenalin aktiviert, stimuliert die Adenylat-Cyclase (AC) und vermittelt eine akute Steigerung der Herzfrequenz und der Kontraktilität. Gai ist an Cholinrezeptoren gekoppelt, wird durch Acetylcholin aktiviert und inhibiert die Adenylat-Cyclase. Angiotensin-Rezeptoren (AT1, AT2), der ET-1-Rezeptor und  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren sind vorrangig an Gaq gekoppelt.

#### 2.3.4.1.1 Pro-hypertrophe Signaltransduktion über Gαq

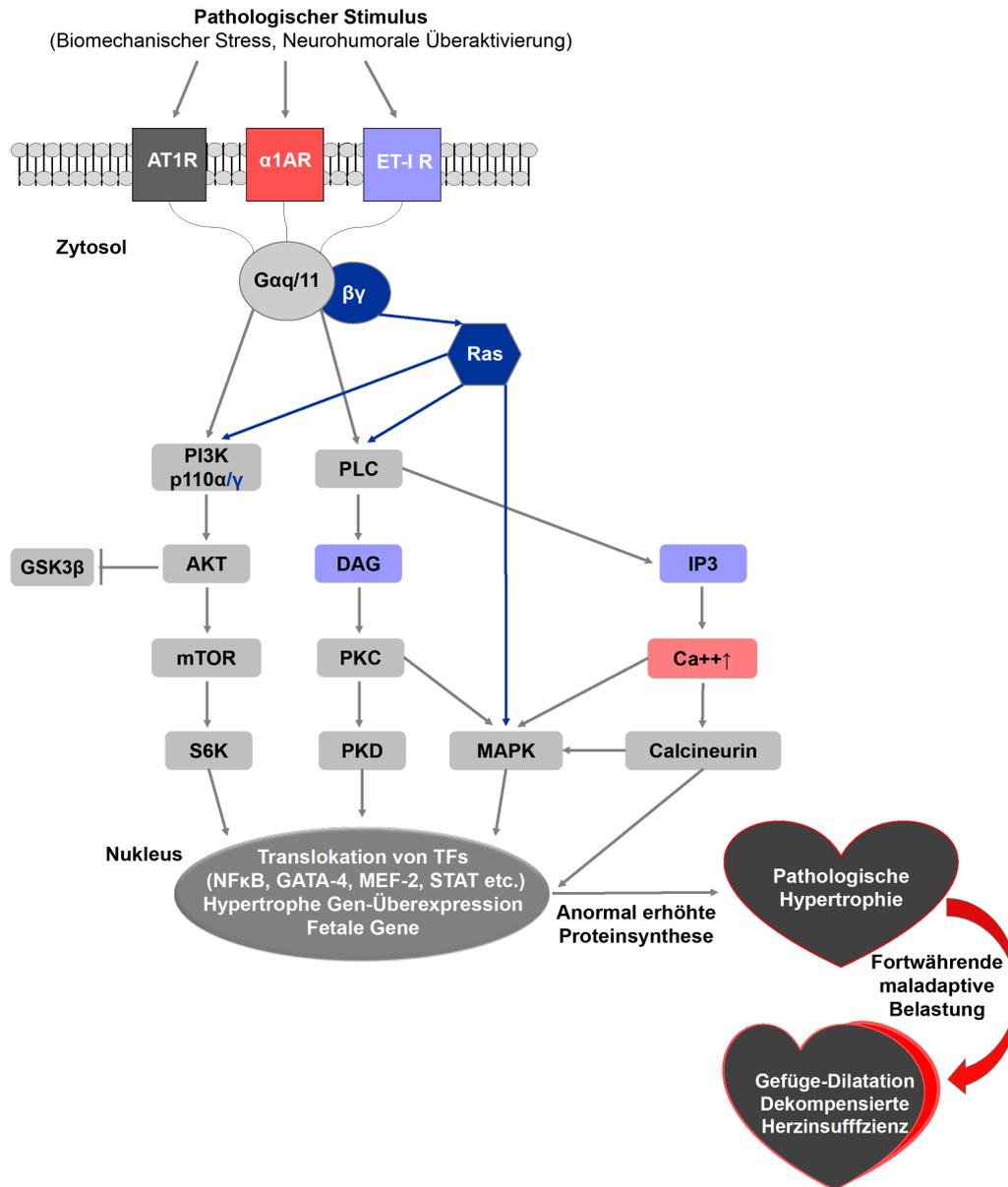
Mittlerweile demonstrierten zahlreiche Studien eine bedeutende Rolle der Gαq-induzierten Signalwege bei der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie. So zeigten schon vor einigen Jahren *in vitro* Studien an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, dass parakrine und/oder autokrine Stimulation Gαq-gekoppelter Rezeptoren mit ET-1, AngII und den α-Adrenorezeptor-Agonisten Noradrenalin und Phenylephrin zur Kardiomyozyten-Hypertrophie führten (Knowlton et al., 1993; Sadoshima et al., 1993; Shubeita et al., 1990). Überexpression von Gαq im Mausmodell resultierte in der Ausprägung eines hypertrophen Phänotyps, der im Ausmaß der kardialen Hypertrophie, der Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und des Expressionsmusters fetaler Gene dem Phänotyp, der durch chronische Druckbelastung induziert wird, gleichkommt (D'Angelo et al., 1997; Sakata et al., 1998). Dem gegenüber entwickelten transgene Mäuse, denen die G-Proteine Gαq und Gαq/11 fehlten oder bei denen die Gαq-vermittelte Signalkaskade inhibiert wurde, in Folge einer Druckbelastung keine Hypertrophie (Wettschureck et al., 2001). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Gαq-induzierte Signalkaskade notwendig und ausreichend zur Induktion der pathologisch hypertrophen Antwort ist.

#### 2.3.4.1.2 Signaltransduktion down-stream von Gq

Als down-stream Mediatoren Gq-induzierter Signalwege zur Vermittlung hypertropher Antworten werden unter Anderem einigen Isoformen der Proteinkinase C (Hahn et al., 2003; Inagaki et al., 2002) und den MAP (Mitogen-aktivierte Protein)-Kinasen wesentliche regulatorische Bedeutungen zugeschrieben. In Folge einer Ligandenbindung an G(q)-Protein gekoppelte Rezeptoren vermag die freie βγ-Untereinheit des G-Proteins die MAP-Kinase (MAPK) Kaskade und den PI3Kp110γ-Pathway über den Ras-Raf-Signalweg direkt zu initiieren (Crespo et al., 1994). Die α-Untereinheit vermittelt die Phosphorylierung der MAPK über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Auch erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen induzieren die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK42/44 (ERK1/2) und JNK. Des Weiteren führt das Auftreten mechanischen Stresses zur Aktivierung der beiden genannten Kinasen und zur Phosphorylierung der dritten Klasse der MAP-Kinasen, der p38. JNK und p38 induzieren pro-apoptotische maladaptive Antworten, die ERK42/44 führt zur Induktion einer adaptiven Hypertrophie (Baines und Molckentin, 2005). Vor einiger Zeit wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der ERK42/44 für die charakteristische Zunahme der

---

Sarkomerorganisation in Folge hypertropher Stimulation notwendig ist, zur erhöhten Promotoraktivität des fetalen Gens ANF und zur Transaktivierung des „immediate early“ Gens c-fos führte, typischen Merkmalen pathologisch hypertrophierter Myozyten (Gillespie-Brown et al., 1995; Thorburn et al., 1994a; Thorburn et al., 1994b). Darüber hinaus konnte die durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Agonisten Phenylephrin induzierte maladaptive Hypertrophie durch Inhibition der ERK42/44 verhindert werden (Glennon et al., 1996). Diese Studien weisen darauf hin, dass ERK-vermittelte Signalwege an der Kardiomyzyten-Hypertrophie beteiligt sind, identifizierten die Kinase aber nicht als potenten Mediator, dessen Aktivierung für die Ausprägung des hypertrophen Phänotyps ausreicht. Dies weist darauf hin, dass die ERK an der Induktion der kompensierten Hypertrophie und nicht am Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz beteiligt ist. Mittlerweile legen sogar einige Arbeiten die Vermutung nahe, dass die ERK42/44 an der Entwicklung der physiologischen Hypertrophie inklusive einer Verbesserung der kardialen Funktion beteiligt ist (Bueno et al., 2000).



**Abb. 3: Neurohumoral/ $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Signaltransduktion down-stream von G $\alpha$ q/11**

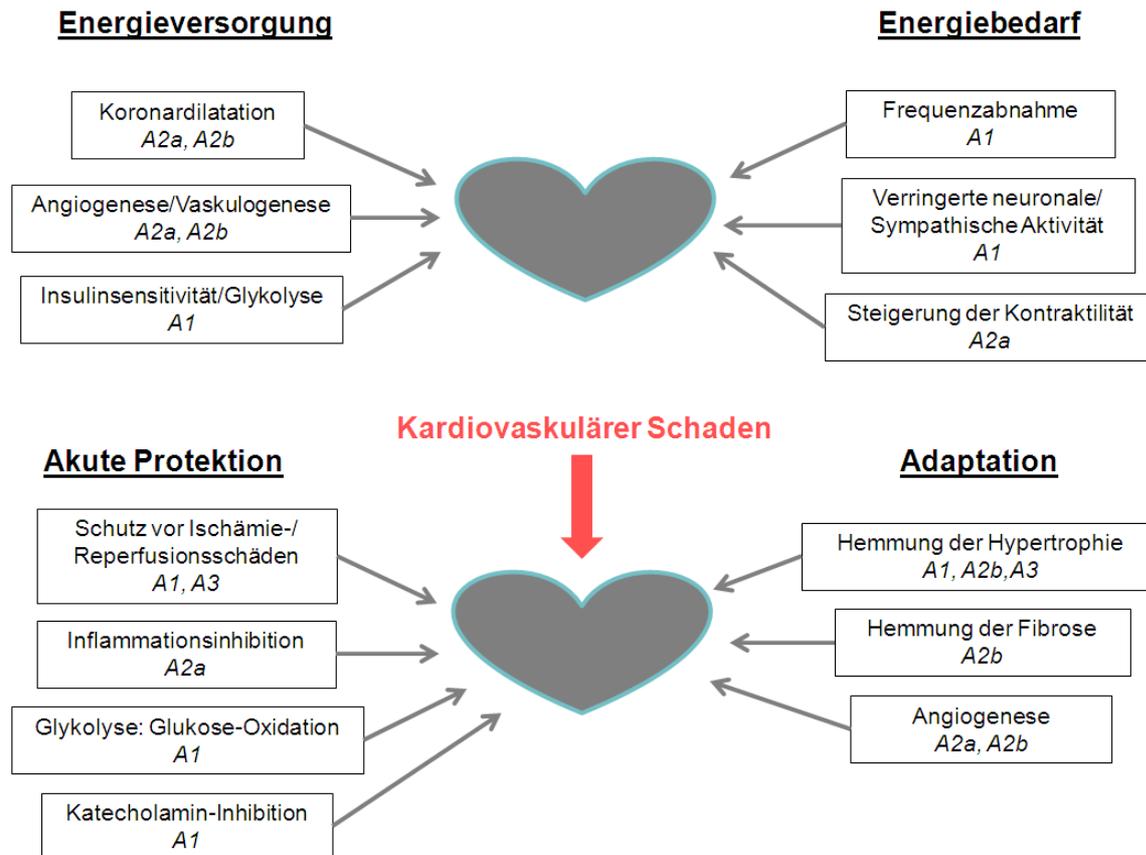
Biomechanischer Stress/neurohumorale Überaktivierung des RAAS induziert unter Anderem die Hypertrophie über G $\alpha$ q-gekoppelte AT1-, ET-1- und  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Aktivierung. Die G $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert nach GTP-Hydrolyse von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die PI3Kp110 $\alpha$ /AKT/mTOR/S6K Kaskade. Weiterhin aktiviert G $\alpha$ q/11 über PLC die Bildung der „Second messenger“ DAG und IP3. DAG aktiviert die PKD und vermittelt über PKC die MAPK-Aktivierung. IP3 ruft eine erhöhte Ca<sup>++</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum hervor, was zur Aktivierung der MAPK und von Calcineurin führt. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheit vermag über Ras/Raf die PLC, PI3Kp110 $\gamma$  und die MAPK direkt zu aktivieren. Die Effektoren der Kaskaden (S6K, PKD, MAPK, Calcineurin) initiieren schließlich die Translokation von Transkriptionsfaktoren (TFs) in den Nucleus und die von diesen vermittelte hypertrophe Gen-Überexpression, sowie die Reaktivierung fetaler Gene. Die resultierende anormal gesteigerte Proteinsynthese führt zur Hypertrophie, die bei fortwährender maladaptiver Belastung in die dekompensierte Herzinsuffizienz mit kardialer Dysfunktion übergeht.  $\alpha_1$ AR= $\alpha_1$ -Adrenorezeptor, AT1R=Angiotensin 1 Rezeptor, ET-1=Endothelin-1-Rezeptor, PI3K=Phosphatidylinositol-3 Kinase, mTOR=mammalian target of Rapamycin, S6K=Ribosomale S6 Kinase, GSK3 $\beta$ =Glycogensynthasekinase 3  $\beta$ , PLC=Phospholipase C, DAG=Diacylglycerol, IP3=Inositol-1,4,5-triphosphat, PKC/D=Proteinkinase C/D, MAPK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase

## 2.4 Prävention des maladaptiven Remodelings

Bisher wurden zahlreiche Induktoren und Effektoren der prognostisch ungünstigen kardialen Umbauprozesse im Zuge der pathologischen Hypertrophie beschrieben. Die Zahl identifizierter Faktoren, welche kardioprotektive Wirkungen in Folge eines maladaptiven Ereignisses ausüben, ist jedoch begrenzt. Es wird mittlerweile spekuliert, dass Kardioprotektion mit einer erhöhten Adenosinkonzentration im Zusammenhang steht. Darüberhinaus werden immer häufiger prognostisch günstige Effekte von Ausdauersport auf den Remodeling-Prozess diskutiert.

### 2.4.1 Adenosin, der Kardioprotektor

Adenosin ist ein ubiquitäres Produkt des Adenin-Nukleotid-Katabolismus und repräsentiert einen bedeutenden lokalen parakrinen und autokrinen Regulator der Gewebefunktion. Dem Nukleosid kommt unter Normalbedingungen, vor allem aber unter Stresseinwirkung, eine große modulatorische Bedeutung im kardiovaskulären System zu. In Folge von metabolischem Stress und Zellschäden, wie Inflammation, Hypoxie, Ischämie und Verletzungen wird Adenosin vom Myokard produziert (Linden, 2001). Hierbei steigt der intrazelluläre Adenosinlevel drastisch an, was eine Freisetzung des Nukleosids zur Folge hat. Das aktive Autakoid agiert dann direkt über Bindung seiner G $\alpha$ -gekoppelten Rezeptoren A1 und A3 bzw. seiner G $\beta\gamma$ -gekoppelten Rezeptoren A2a und A2b und Induktion nachgeschalteter Signalkaskaden in Kardiomyozyten, vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen oder indirekt über Wirkungen an synaptischer Transmission im autonomen Nervensystem oder an inflammatorischen Zellen. Es existieren fünf grundsätzliche zelluläre Antworten, über deren Auslösung aktivierte Adenosinrezeptoren das myokardiale Gewebe schützen und die Gewebereparatur unterstützen: (1) die Erhöhung der Sauerstoffversorgung, vor allem unter hypoxischen Bedingungen, durch Regulation des vaskulären Widerstandes, einhergehend mit der Erniedrigung des Sauerstoffbedarfs erregbarer Gewebe, (2) die anti-inflammatorische Wirkung, (3) die Induktion der Neoangiogenese, (4) der Schutz vor Ischämie- und Reperfusionsschäden, der teilweise auf Inhibition der schädigenden Effekte oxidativen Stresses zurück zu führen ist und (5) die Adaptation bei chronischen Stresstimuli (Headrick et al., 2011; McIntosh und Lasley, 2012).



**Abb. 4: Auswahl Adenosin-vermittelter Effekte unter physiologischen und pathologischen Bedingungen und Rezeptor-Subtypen, die an den jeweiligen Wirkungen vorrangig beteiligt sind**

Adenosin steigert die Energieversorgung des Herzens durch Vasodilatation, Induktion der Angiogenese/Vaskulogenese, Erhöhung der Insulinsensitivität und durch vermehrte Glykolyse. Gleichzeitig senkt Adenosin den Energiebedarf durch Abnahme der Herzfrequenz, und Verringerung neuronaler und sympathischer Aktivität. In pathologischen Situationen ist das Adenosin-System an der akuten Protektion beteiligt, indem es vor Ischämie- und Reperfusionsschäden schützt, inflammatorische Prozesse inhibiert, die Glukose-Oxidation initiiert und die Katecholamin-Freisetzung/Aktivierung hemmt. Adaptive Mechanismen löst Adenosin über anti-hypertrophe und anti-fibrotische Effekte, sowie über Induktion der Angiogenese aus (Headrick et al., 2011; Linden, 2001).

#### 2.4.1.1 Adenosin und kardiovaskuläre Erkrankungen

Mittlerweile wurden in Bluthochdruck-Modellen, während und nach Myokardinfarkt, sowie bei chronischer Herzinsuffizienz erhöhte Plasma-Adenosinspiegel dokumentiert (Funaya et al., 1997), wobei der Grad der Plasmakonzentration mit der New York Heart Association (NYHA) Klassifizierung für den Schweregrad der Krankheit korreliert. Die Beobachtungen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit erhöhten Adenosinkonzentrationen assoziiert sind, könnten auf einen kompensatorischen Mechanismus hinweisen und legen die Vermutung nahe, dass das Adenosinsystem einen bedeutenden endogenen Regulator des myokardialen Remodeling-Prozesses

repräsentiert. So wurde bereits demonstriert, dass erhöhte Adenosinlevel, provoziert durch Inhibition des Nukleosidtransports mittels Dipyridamol und Dilazep, unter Verbesserung der Ejektionsfraktion und des maximalen Sauerstoffverbrauchs, den Schweregrad der Herzinsuffizienz reduzieren (Asakura et al., 2007; Kitakaze et al., 1998). Konsistent mit dieser Beobachtung schwächt eine erhöhte endogene Adenosinkonzentration im chronischen Hochdruckmodell die Entwicklung einer pathologisch erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Füllung und die adrenerge Dysfunktion im Rattenherz ab (Chung et al., 1998). Im Gegensatz dazu resultierte in diesem Schadensmodell eine Deletion der 5'Ectonukleotidase, einem der Hauptregulatoren des Adenosin-Metabolismus, und die daraus resultierende Abnahme der Adenosinkonzentration in einer verstärkten Ausprägung kardialer Fibrose und Hypertrophie, die von einer erhöhten mTOR-Signaltransduktion und einer ANF-Heraufregulation begleitet ist (Xu et al., 2008). Liao und Kollegen demonstrierten zudem, dass eine unselektive Stimulation der Adenosinrezeptoren im Bluthochdruck-Modell in Ratten von einer Reduktion der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche, des Herzgewicht/Körpergewichts-Verhältnisses, der BNP-Expression, des inhibitorischen Faktors der Hypertrophie RGS-4 („Regulator of G-protein signaling 4“), der Hinterwandverdickung, sowie der myokardialen und perivaskulären Fibrose gekennzeichnet war (Liao et al., 2003). Der Einfluss von Adenosin auf die Kardiomyozyten-Hypertrophie, die Fibroblasten-Proliferation, die Kollagensynthese, die extrazelluläre Matrix, die Apoptose und die kardiale Architektur könnte eine bedeutende adaptive strukturelle Antwort auf hämodynamischen, ischämischen und oxidativen Stress und andere maladaptive Stimuli darstellen und folglich einen Präventivmechanismus im Zuge des Remodelings *in vivo* repräsentieren.

#### **2.4.1.1.1 Adenosin-vermittelte anti-fibrotische Effekte**

Adenosin-vermittelte anti-fibrotische Effekte wurden bereits für den A2b-Rezeptor in Ratten *in vitro* (Chen et al., 2004; Dubey et al., 1999; Dubey et al., 2001; Epperson et al., 2009) und *in vivo* (Wakeno et al., 2006) dokumentiert. Villarreal und Kollegen zeigten, dass eine Kombination aus A2a- und A2b-Rezeptor cAMP-abhängig die kardiale Fibroblasten-Proliferation und die Fibrose über Aktivierung des PI3K-Signalwegs hemmt (Epperson et al., 2009; Villarreal et al., 2009). Dem A2b-Subtyp konnte weiterhin eine anti-apoptotische Wirkung im nicht-infarzierten Areal zuge-

schrieben werden, die anscheinend über Modulation der pro-apoptotischen PKC- $\delta$ /p38- und Bad-Signalwege vermittelt wird (Simonis et al., 2009).

#### **2.4.1.1.2 Adenosin-vermittelte anti-inflammatorische Effekte**

Es ist mittlerweile bekannt, dass Adenosin und seine Analoga die Bildung inflammatorischer Zytokine in inflammatorischen Zellen, Myozyten und Fibroblasten inhibieren (Blackburn et al., 2009). Vor einigen Jahren wurde bereits belegt, dass das Autakoid, agierend über den A<sub>2a</sub>-Rezeptor, die Expression des Zytokins TNF $\alpha$  in Herzmuskelzellen des insuffizienten menschlichen Herzens und in isolierten Ratten-Kardiomyozyten inhibiert (Wagner et al., 1998; Wagner et al., 1999).

#### **2.4.1.1.3 Adenosin-vermittelte anti-hypertrophe Effekte**

*In vitro* Studien ergaben, dass eine selektive Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoraktivierung mittels CPA (N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin) die TNF $\alpha$ -induzierte hypertrophe Antwort (Liao et al., 2011) und die durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin (PE) induzierte Zunahme der Proteinbiosyntheserate (Liao et al., 2003), der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und der ANF-Expression (Gan et al., 2005) vollständig hemmte. Pang und Kollegen zeigten zudem, dass die PE-induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie von einer transkriptionellen und translationalen Heraufregulation der Adenosinrezeptor-Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub> und A<sub>3</sub> begleitet war (Pang et al., 2010a). Diese Beobachtung könnte auf einen Adenosin-vermittelten Kompensationsmechanismus in Folge maladaptiver  $\alpha$ -adrenerger Stimulation hinweisen, bedarf jedoch einer Verifizierung *in vivo*. Es wird spekuliert, dass die Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems zumindest teilweise durch die PE-bedingte Expressionszunahme der 5'Ectonukleotidase (CD73) und die durch deren Aktivität gesteigerte Adenosinproduktion hervorgerufen wird (Pang et al., 2010a). Da TNF $\alpha$  und Phenylephrin eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung der maladaptiven Hypertrophie und deren Progression in die manifeste Herzinsuffizienz haben (Force et al., 2002), könnten diese Beobachtungen auf eine bedeutende protektive Funktion von Adenosin, vorrangig vermittelt durch den A<sub>1</sub>-Rezeptor, bei chronischer Druckbelastung des Herzens hinweisen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die kompensierte Myokardhypertrophie nach Aorten-Konstriktion im Rattenmodell von einer Expressionszunahme des A<sub>1</sub>-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene begleitet war, wohingegen der Übergang in die dekompenzierte Herzinsuffizienz mit einer Herabregulati-

on des Rezeptors einherging (Perlini et al., 2007). Weiterhin demonstrierten Liao und Kollegen, dass ein selektiver A1-Rezeptor-Agonismus in diesem Schadensmodell in der Maus von einer Reduktion der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und des Herzgewicht/Körpergewichts-Verhältnisses gekennzeichnet war (Liao et al., 2003).

#### **2.4.1.1.3.1 Effektoren der Adenosin-vermittelten anti-hypertrophen Effekte in Folge $\alpha$ -adrenerger Stimulation**

Es gibt mittlerweile Hinweise darauf, dass die Adenosin-vermittelte Inhibition der PE-induzierten Kardiomyozyten-Hypertrophie zumindest teilweise durch differentielle Phosphorylierung der AMP-Kinase (AMPK) vermittelt werden könnte. So konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation eine zeitabhängige Aktivierung der Phosphorylierungsstelle Ser<sup>485/491</sup>, hingegen die Stimulation von Adenosinrezeptoren eine schnelle Phosphorylierung von Thr<sup>172</sup> in der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der AMPK initiiert (Pang et al., 2010b). Erstgenannte posttranslationale Modifikation induziert pro-hypertrophe, letztere anti-hypertrophe Effekte. Fassett und Kollegen identifizierten die Adenosin-Kinase (AK) als einen bedeutenden Vermittler der Adenosin-bedingten Hemmung PE-induzierter Kardiomyozyten-Hypertrophie, wobei die Kinase zumindest teilweise über Inhibition der Raf-Signaltransduktion zu mTOR/P70S6K agiert (Fassett et al., 2011; Xu et al., 2008). Des Weiteren wurde NHE1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1), welches als potenter Mediator der Hypertrophie gilt (Karmazyn et al., 2001; Mraiche et al., 2011), eine Schlüsselrolle bei der Adenosin-vermittelten Antagonisierung PE-induzierter Hypertrophie zugeschrieben (Avkiran und Yokoyama, 2000; Gan et al., 2005). Auch der erhöhten Expression des „immediate early“ Gens c-fos wird eine Bedeutung bei der Entwicklung der Kardiomyozyten-Hypertrophie zuteil. So bewirkt eine PE-Stimulation innerhalb von 15-30 min eine Transkriptionssteigerung des Gens, welche durch gleichzeitige A1-Rezeptor Aktivierung unterbunden werden kann (Gan et al., 2005). Studien an isolierten ventrikulären Myozyten lieferten zudem Hinweise darauf, dass die A2a- und A3-Subtypen ihre anti-hypertrophe Wirkung in Folge einer Phenylephrin-Behandlung über die Öffnung mitochondrialer K<sub>ATP</sub>-Kanäle vermitteln (Xia et al., 2004; Xia et al., 2007), wohingegen eine A1-Stimulation der PE-bedingten Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration und der Zellverkürzung vermutlich über Öffnung sarkolemmaler K<sub>ATP</sub>-Kanäle entgegenwirkt (Hoque et al., 2000; Xia et al., 2007). Der Effekt einer selektiven A1-Aktivierung auf

die  $\alpha$ -adrenerg induzierte Hypertrophie und auf die down-stream Effektoren dieser pro-hypertrophen Signaltransduktion wurde jedoch bisher nicht *in vivo* untersucht.

#### **2.4.1.1.4 Adenosin-vermittelte Effekte auf die kardiale Geometrie**

Adenosin hemmt die TNF $\alpha$ -Produktion, die Noradrenalin-Ausschüttung aus prä-synaptischen Vesikeln (Rongen et al., 1996), vermutlich über Aktivierung des A1-Rezeptors (Snyder et al., 1998), was zur Verringerung des Herzzeitvolumens und des peripheren vaskulären Widerstandes führt, inhibiert die Produktion des Vaso-konstriktors ET-1 (Stowe et al., 1997) und wirkt der RAAS-Aktivierung entgegen (Taddei et al., 1992). Die genannten Mediatoren des linksventrikulären Remodelings, AngII, ET-1, Noradrenalin, TNF $\alpha$ , sowie die durch einige dieser Faktoren vermittelte ROS-Produktion, aktivieren neben Anderen den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und initiieren über diesen die Transkription der MMP-9. Diese ist maßgeblich am Kollagenabbau im Zuge des Remodelings beteiligt. Es wurde bereits eine A2b-Rezeptor-induzierte Hemmung der MMP-9-Expression in Makrophagen dokumentiert, die über die Reduktion der TNF $\alpha$ -Produktion in der Folge vaskulärer Schäden auftrat (Chen et al., 2011). Hierbei scheint ein Mechanismus von Bedeutung zu sein, der die Aktivierung des cAMP/PKA (Proteinkinase A)-Signalwegs einschließt (Zhao et al., 2008). Desweiteren erfahren MMPs über diesen Signalweg eine Adenosin-A2a-Rezeptor-bedingte Sekretionsinhibition aus Neutrophilen (Ernens et al., 2006), welche als erste Gruppe inflammatorischer Zellen eine Rekrutierung zum Infarktareal erfahren. Die beschriebenen Beobachtungen legen nun die Vermutung nahe, dass Adenosin-vermittelte Signaltransduktionswege der Degradation der extrazellulären Matrix und folglich der linksventrikulären Dilatation und der Ausbreitung des infarzierten Areals nach Myokardinfarkt entgegenwirken könnten.

## **2.4.2 Kardioprotektion durch Ausdauersport**

Mittlerweile wird Patienten mit kompensierter Herzinsuffizienz körperliche Aktivität angeraten, was lange Zeit als kontraindiziert galt. Die „Exercise in Left Ventricular Dysfunction (ELVD)“ Studie demonstrierte z. B. eine sportbedingte Verbesserung der kardialen Funktion (Giannuzzi et al., 1997). In den letzten Jahren wurden diverse günstige klinische und funktionelle Effekte körperlicher Aktivität auf das Ausmaß der Herzinsuffizienz dokumentiert, wie z. B. die Erhöhung der Kapillardichte, des Blutflusses, der mitochondrialen Volumendichte und der Fasergröße, die Verringerung

des vaskulären Widerstands (Dubach et al., 1997; Hambrecht et al., 1997; Hambrecht et al., 2000), die Zunahme der Baroreflex-Sensitivität und des Vagaltonus (Kiilavuori et al., 1995; Liu et al., 2000; Pliquett et al., 2003), die Abnahme zirkulierender NT-proBNP (Aminoterminaler Abschnitt des BNP-Peptids)-Level (Delagardelle et al., 2002) und der GRK2 (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2)-Aktivität (Lymperopoulos et al., 2007), sowie die Aufrechterhaltung der Katecholaminkonzentrationen und der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptordichte (Rengo et al., 2010).

#### **2.4.2.1 Einfluss von Ausdauersport auf den Remodeling-Prozess**

Neben Anderen demonstrierte die INTERHEART-Studie, dass physische Aktivität das Infarktisiko senkt (Held et al., 2012). Vom klinischen Standpunkt betrachtet gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass körperliches Training auch nach Myokardinfarkt einen günstigen Effekt auf das Fortschreiten der Krankheit und die Überlebensrate ausübt (Coats, 2000; You Fang und Marwick, 2003). Studien zu den Effekten von Ausdauersport nach abgelaufenem Myokardinfarkt weisen auf eine Abschwächung der LV-Dilatation und eine verbesserte systolische Funktion in Patienten mit ausgeprägten Vorderwandinfarkten hin (Shephard und Balady, 1999). Dennoch dokumentieren zahlreiche Studien widersprüchliche Wirkungen des Ausdauertrainings auf das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt, in Abhängigkeit von der vorliegenden Infarktgröße und dem Startzeitpunkt der körperlichen Aktivität. So demonstrierten einige Untersuchungen, dass Sport nach einem moderaten Infarkt die linksventrikuläre Geometrie und Funktion positiv beeinflusst, unabhängig davon, ob die körperliche Aktivität früh nach dem kardialen Ereignis (Giannuzzi et al., 1993; Koizumi et al., 2003; Otsuka et al., 2003) oder spät, d. h. nach einem Jahr, einsetzte (Giannuzzi et al., 2003). Untersuchungen im Ratten-Modell zeigten, dass spätes Training nach vollständigem Abheilen, d.h. mehr als 3 Wochen nach einem moderaten, etwa 35% der linksventrikulären Masse umfassenden Myokardinfarktes keinen Effekt auf die LV-Dilatation und -Hypertrophie ausübte (Gaudron et al., 1994; Libonati, 2003), oder eine solche abschwächte (Orenstein et al., 1995; Wisloff et al., 2002; Zhang et al., 2000). Dennoch wiesen auch einige klinische Studien auf ausbleibende (Giannuzzi et al., 1993; Otsuka et al., 2003) oder sogar schädigende Auswirkungen körperlicher Aktivität auf die EF und das ventrikuläre Volumen hin (Kubo et al., 2004). Dies zeigte sich, sofern der Sport nach einem ausgeprägten Infarkt zu einem Zeitpunkt begonnen wurde, als der maladadaptive Remodeling-Prozess noch in

Gang war, d.h. etwa 3-4 Monate nach Infarkt. Eine im Jahr 2011 durchgeführte Meta-Analyse ergab jedoch, dass eine maximale kardioprotektive Wirkung des Ausdauertrainings dann erreicht wird, wenn das Training eine Woche nach Myokardinfarkt gestartet und über 6 Monate fortgesetzt wurde (Haykowsky et al., 2011). Im Tierversuch wurde wiederum gezeigt, dass Ausdauertraining, das weniger als eine 1 Woche nach moderatem oder großem Myokardinfarkt initiiert wurde, keine (Alhaddad et al., 1998) oder nachteilige Effekte (Gaudron et al., 1994; Kloner und Kloner, 1983) auf das linksventrikuläre Remodeling ausübte. De Waard und Kollegen zeigten im Gegensatz dazu, dass frühes Lauftraining in Mäusen nach einem akuten ausgeprägten Myokardinfarkt eine verbesserte linksventrikuläre Funktion nach sich zog, vermutlich durch verbesserte  $\beta_1$ -adrenerge Signaltransduktion und Myofilament-Funktion (De Waard et al., 2007). Neben den beschriebenen Effekten physischer Aktivität nach abgelaufenem Herzinfarkt, konnte mittlerweile auch gezeigt werden, dass vor dem kardialen Event über längere Zeit kontinuierlich durchgeführtes Schwimmtraining das Ausmaß der chronischen Umbauprozesse im Myokard eindämmt (Dayan et al., 2005). Dies weist auf einen eventuellen Präventivmechanismus hin. Aufgrund der zahlreichen divergierenden Beobachtungen ist es unerlässlich, die kardioprotektive Wirkung des Ausdauersports im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf das ventrikuläre Remodeling eingehender zu untersuchen, um die positiven Effekte dieser günstigen Therapieform bestmöglich nutzen zu können. Die bisherigen Studien zu den protektiven Effekten des Ausdauersports fokussierten sich - im Patienten nicht anders möglich - hauptsächlich auf dessen Einfluss auf die Auswurfraction, als Maß der kardialen Funktion und auf die linksventrikulären Kavitätsgrößen, als Maß für die kardialen Umbauprozesse. Tierstudien demonstrierten mittlerweile auch, dass 8-wöchiges Lauftraining zu einer geringeren Ausprägung kardialer Fibrose im nicht-infarzierten linken Ventrikel führte (De Waard et al., 2007; Xu et al., 2008), vermutlich über Herabregulation des AT1-Rezeptors und der ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Transkription (Xu et al., 2008). Eine aktuelle Studie zeigte zudem positive Effekte des Lauftrainings auf die Kollagenvernetzung (Yengo et al., 2012). Die Auswirkungen kontinuierlicher physischer Aktivität vor und nach Myokardinfarkt auf die strukturellen kardialen Veränderungen, insbesondere auf die Aktivität der MMPs 2 und 9 als Risikomarker für den Remodeling-Prozess wurden bisher nicht untersucht. Zudem sind die molekularen Mechanismen bzw. die intrazellulären Effektoren, über

die Ausdauertraining günstige Wirkungen auf das ventrikuläre Remodeling und die kardiale Funktion ausübt, noch weitestgehend unklar.

#### **2.4.2.2 Ausdauersport und Adenosin: Teamplayer?**

Es ist mittlerweile bekannt, dass die Adenosinkonzentration nicht nur im insuffizienten Herzen, sondern auch nach Ausdauertraining im Herzen erhöht ist (Funaya et al., 1997). So wurde z. B. gezeigt, dass eine gesteigerte Aktivität der 5'-Nukleotidase, dem Hauptregulator des Adenosin-Metabolismus, nach 6-wöchigem Ausdauertraining im linken Ratten-Ventrikel vorlag (Langfort et al., 1996). Diese Beobachtung könnte auf eine Beteiligung des Adenosin-Systems an der Induktion der physiologischen Hypertrophie hinweisen. Die Tatsache, dass die Adenosinrezeptoren A1 und A3 über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit ihrer G $\alpha$ i-gekoppelten Rezeptoren den PI3K-Signalweg, welcher als Mediator der physiologischen Hypertrophie impliziert wird, zu aktivieren vermögen, könnte eine Verbindung zwischen dieser Signalkaskade und Adenosin-induzierter Signaltransduktion darstellen. Weiterhin kann spekuliert werden, dass die vermehrte Substratbildung der Adenosinrezeptoren auf eine regulatorische Funktion des Adenosin-Systems im Zuge der Sport-bedingten Kardioprotektion hindeutet. So wurde Adenosin z. B. bereits als Sekretions- bzw. Produktionsinhibitor von Katecholaminen und TNF $\alpha$  identifiziert (Rongen et al., 1996; Stowe et al., 1997; Taddei et al., 1992; Wagner et al., 1998; Wagner et al., 1999) und die Ausdauer-sport-vermittelte Kardioprotektion scheint mit einer Aufrechterhaltung der Katecholaminkonzentration und der Konzentrationsabnahme inflammatorischer Marker wie TNF  $\alpha$  assoziiert zu sein (Larsen et al., 2001; Rengo et al., 2010). Weiterhin demonstrierten Brown und Kollegen, dass die Ausdauertraining-induzierte Protektion vor Ischämie-/Reperfusionsschäden eine erhöhte Expression sarkolemmaler K<sub>ATP</sub>-Kanäle involviert (Brown et al., 2005), deren Aktivierung bei der anti-hypertrophen Wirkung des Adenosin-A1-Rezeptors beobachtet wurde (Xia et al., 2007). Somit könnte der kardioprotektiven Wirkung des Ausdauersports ein Mechanismus zu Grunde liegen, der eine gesteigerte Aktivierung der Adenosin-Signaltransduktion involviert. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnte folglich zumindest teilweise die positiven Effekte von Ausdauersport auf den Remodeling-Prozess und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz erklären und weiterhin den Einsatz dieser günstigen und effektiven Therapieform nahe legen.

## 2.5 Zielsetzung

### 2.5.1 Teilprojekt 1: Charakterisierung der Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation *in vitro* und *in vivo*

Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen der westlichen Industrienationen dar und ist mit einer ungünstigen Prognose und einer hohen Letalität assoziiert. Ein vorrangiger Mechanismus der Herzinsuffizienz ist die pathologische Hypertrophie, als Folge chronischer mechanischer Belastungen und der Aktivierung neurohumoraler und  $\alpha$ -adrenerger Signaltransduktion. Der pathologisch hypertrophe Phänotyp zeichnet sich durch die Kardiomyozyten-Hypertrophie, quantitative und qualitative Veränderungen der Gen- und Proteinexpression, sowie durch apoptotische, fibrotische und inflammatorische Ereignisse aus. Dies mündet in diversen strukturellen und elektrophysiologischen Umbauvorgängen des linken Ventrikels - dem Remodeling.

Die Hypothese des ersten Teilprojekts lautet, dass Adenosin, dem die Vermittlung zahlreicher kardioprotektiver Effekte zugeschrieben wird, auch eine regulatorische Funktion beim kardialen Remodeling zukommt. Diese Hypothese wird z. B. dadurch gestützt, dass eine selektive Adenosin-A1-Rezeptor-Aktivierung *in vitro* die Pheny-lephrin (PE)- und die TNF $\alpha$ -vermittelte hypertrophe Antwort (Liao et al., 2011) und die Expression inflammatorischer Faktoren in Kardiomyozyten des insuffizienten Herzens inhibiert (Wagner et al., 1998; Wagner et al., 1999). Darüber hinaus wurden bereits anti-fibrotische Effekte des Adenosin-A2b-Rezeptors *in vitro* (Epperson et al., 2009) und *in vivo* (Wakeno et al., 2006) dokumentiert. Adenosin wurde auch als bedeutender negativer Regulator der Matrixmetalloproteinasen (MMPs), insbesondere der MMP-9 identifiziert (Ernens et al., 2006). Die MMP-9 wurde bereits als Risikomarker für die Entwicklung des linksventrikulären Remodelings und einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt beschrieben (Wagner et al., 2006) und ist zusammen mit der MMP 2 maßgeblich an der Ruptur des fibrillären Kollagen-Netzwerks und der Gefüge-Dilatation des linken Ventrikels beteiligt.

---

Um die Hypothese zu prüfen, dass Adenosin-induzierte Signalwege vor dem maladaptiven Remodeling schützen, sollte

- a) zunächst Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors, dem die Vermittlung Adenosin-induzierter anti-hypertropher Effekte zugeschrieben wird, in Folge hypertropher Stimulation in isolierten neonatalen Kardiomyozyten charakterisiert werden. Hierfür sollte der Effekt des selektiven Adenosin-A1-Rezeptor-Agonisten CPA (N6-Cyclopentyladenosin) auf die hypertrophe Antwort, initiiert durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin, das endogene Hormon Angiotensin II oder den physiologischen Stimulus Igf-I anhand charakteristischer Marker einer kardiomyozytären Hypertrophie determiniert werden.
- b) der Effekt einer kontinuierlichen CPA-Infusion auf die pro-hypertrophe und pro-fibrotische Antwort, sowie auf die Expression der MMPs 2 und 9 im Zuge der PE-induzierten maladaptiven Antwort im Mausmodell untersucht werden.
- c) eine PE-bedingte Modulation des Adenosinrezeptor-Systems im Mausmodell *in vivo* geprüft werden.
- d) geklärt werden, ob ein A1-Rezeptor-vermittelter Schutz vor dem Übergang der kompensierten Hypertrophie zum maladaptiven Remodeling die Regulation der MAP-Kinase ERK1/2, der anti-hypertrophen GSK3 $\beta$  und/oder der kardioprotektiven Kinasen AKT und der p70S6K als Komponenten des PI3K-Signalwegs involviert.

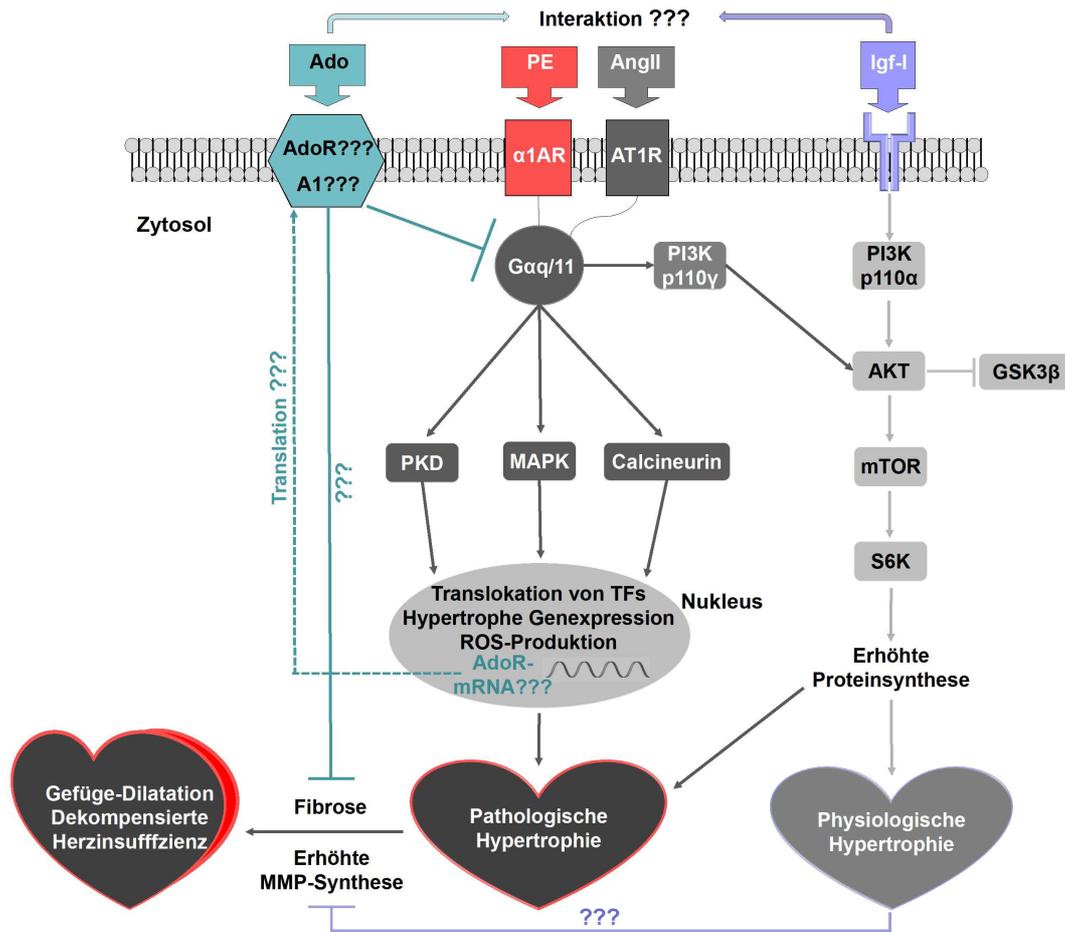
### **2.5.2 Teilprojekt 2: Untersuchungen zum Effekt körperlicher Aktivität vor und nach Myokardinfarkt auf den ventrikulären Remodeling-Prozess im Mausmodell mit besonderer Betrachtung der Adenosinrezeptoren und der extrazellulären Matrix**

Kardiale Adenosinkonzentrationen sind sowohl bei Patienten mit Herzinsuffizienz, während und nach Myokardinfarkt, als auch nach Ausdauertraining deutlich erhöht (Funaya et al., 1997; Newman et al., 1984). Es kristallisiert sich heraus, dass Ausdauertraining über Induktion des Igf-I/PI3K-Signalwegs die Ausprägung der physiolo-

gischen Form der Hypertrophie initiiert, die mit einer normalen oder gesteigerten kardialen Funktion assoziiert ist. Ausdauersport bei Patienten mit ventrikulärer Dysfunktion zieht eine Verbesserung der kardialen Funktion nach sich und wirkt sich günstig auf das Remodeling in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aus (Delagardelle et al., 2002; Giannuzzi et al., 1997). Die Effekte von körperlicher Aktivität vor und nach Auftreten eines Myokardinfarktes auf die Ausprägung der pathologischen Hypertrophie, die strukturellen Veränderungen und insbesondere auf die extrazelluläre Matrix und das Adenosin-System wurden bisher weder im Patienten noch im Tiermodell untersucht.

Die Hypothese dieses Teilprojekts lautet, dass körperliche Aktivität vor und nach Myokardinfarkt das Ausmaß des Remodelings abschwächt und somit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegen wirkt, und zwar durch Aktivierung des Igf-I/PI3K-Signalwegs und Stimulation des Adenosinrezeptor-Systems bzw. eventuell über ein Zusammenspiel der beiden Mechanismen. Um diese Hypothese zu testen, sollten Wildtyp-Mäuse für 6 Wochen unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten und anschließend einer permanenten Koronararterien-Ligatur zur Induktion eines Myokardinfarktes bzw. einer Sham-Operation unterzogen werden. Nach weiteren 4 Wochen freiwilliger körperlicher Aktivität bzw. standardisierter Haltung sollte

- a) der kardiale Phänotyp anhand charakteristischer pro-hypertropher und pro-fibrotischer Marker, sowie funktionell charakterisiert werden.
- b) eine durch Ausdauertraining modulierte Expression der Remodeling-Effektoren MMP 2 und 9 und des Kollagens I geprüft werden.
- c) der Einfluss von Ausdauertraining per se und im Schadensmodell auf das Adenosinrezeptor-System untersucht werden.
- d) der Effekt physischer Aktivität auf die Expression der Kinasen AKT, p70S6K und GSK3 $\beta$ , als Komponenten des Igf-I-induzierten PI3K-Signalwegs, und der MAP-Kinase ERK1/2 in diesem Modell untersucht werden, um die molekularen Mechanismen zu beleuchten, die den kardioprotektiven Wirkungen des Trainings zu Grunde liegen.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Fragestellung**

Das neurohumorale Agens AngII und der  $\alpha$ -adrenerge Stimulus PE induzieren die pathologische Hypertrophie über Gaq-vermittelte Aktivierung der MAPK-Kaskade, Calcineurin und der PKD, sowie über  $\beta\gamma$ -abhängige Induktion der PI3Kp110 $\gamma$ -Kaskade. Igf-I aktiviert über Bindung seiner Rezeptortyrosinkinase den PI3Kp110 $\alpha$ -Signalweg und induziert über diesen die Ausprägung der physiologischen Hypertrophie. Mittlerweile wurde demonstriert, dass die Aktivierung des Adenosinrezeptor-Systems der PE-vermittelten hypertrophen Antwort in isolierten Kardiomyozyten entgegen wirkt, und dass die Aktivierung des  $\alpha$ -Adrenorezeptors zur Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems *in vitro* führt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Adenosin-A1-Rezeptors in diesem regulatorischen Prozess *in vitro* charakterisiert werden und geprüft werden, ob die funktionelle und expressionelle Regulation dieses Subtyps auch bei der AngII- oder Igf-I-induzierten hypertrophen Antwort verifiziert werden kann. Weiterhin sollte eine PE-bedingte Expressionsregulation der Adenosinrezeptoren und der Effekt einer kontinuierlichen A1-Aktivierung auf die PE-induzierte Hypertrophie, die Expression pro-fibrotischer Faktoren, sowie der MMPs 2 und 9 *in vivo* untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob Ausdauersport im Vorfeld und nach Myokardinfarkt kardioprotektive Effekte auf das Remodeling und die Entwicklung der Herzinsuffizienz ausübt und, ob diese Wirkung mit einer Aktivierung des Adenosinrezeptor-Systems assoziiert ist. Letztendlich sollte geprüft werden, ob kardioprotektive Mechanismen eine Interaktion des Igf-I-induzierten PI3K-Signalwegs und Adenosin-vermittelter Signaltransduktion involvieren. Ado(R)=Adenosin(Rezeptor), PE=Phenylephrin,  $\alpha$ 1AR= $\alpha$ 1-Adrenorezeptor, AngII=Angiotensin II, AT1R=Angiotensin 1 Rezeptor, Igf-I=Insulin-like growth factor I, PI3K=Phosphatidylinositol-3 Kinase, GSK3 $\beta$ =Glycogensynthasekinase 3  $\beta$ , mTOR=mammalian target of Rapamycin, S6K=Ribosomale S6 Kinase, PKD=Proteinkinase D, MAPK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase, TFs=Transkriptionsfaktoren, MMP=Matrixmetalloproteinase

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Puffer und Lösungen

Blocking-Puffer: 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-Tween-Puffer

DNA-Ladepuffer (5x): 0,25% Bromphenolblau (w/v)  
50% Glycerol (v/v)  
50 mM EDTA

PBS-Puffer (10x): 140 mM NaCl  
25 mM KCl  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM Na/K-Phosphat (pH 7,5)

PBS-Tween-Puffer: 1x TBS-Puffer  
0,5% Tween20 (v/v)

Protein-Ladepuffer (5x): 62,5 mM Tris/HCL (pH 7,6)  
2% SDS (w/v)  
5% β-Mercaptoethanol (v/v)  
50% Glycerol (v/v)  
0,001% Bromphenolblau (w/v)

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris  
0,1% SDS (w/v)  
200 mM Glycin (pH 8,2-8,4)

---

<u>Standard-Lysispuffer</u>	20 mM HEPES (pH 7,4) 1 mM DTT 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (pH 7,4) 1% Triton X-100 (v/v) 10% Glycerol (v/v) 0,4 mM PMSF 2 μM Leupeptin 1% Aprotinin (v/v) 0,5% E64 (v/v) 2 μM Microcystin 50 mM β-Glycerophosphat
<u>TAE-Puffer (50x):</u>	2 M Tris/HCL 250 mM NaAc 500 mM EDTA (pH 7,8)
<u>TBS-Puffer (10x):</u>	500 mM Tris 1,5 M NaCl, (pH 7,5)
<u>TBS-Tween-Puffer:</u>	1x TBS-Puffer 0,5% Tween20 (v/v)
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris/HCL 1 mM EDTA (pH 7,6)
<u>Western-Transfer-Puffer:</u>	25 mM Tris/HCL 192 mM Glycin 20% Methanol (v/v)

Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen sind in Kapitel 3.2 im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt.

### 3.1.2 Nährmedien für die Zellkultur

- Nährmedium zur Kultivierung neonataler Kardiomyozyten  
F-10 (Ham + Glutamin)  
Zuzüglich 10% Horse Serum (v/v)  
Zuzüglich 5% Fötale Kälberserum (v/v)
  
- Hungermedium zur Stimulation neonataler Kardiomyozyten  
F-10 (Ham + Glutamin)

Um bakterielle Kontaminationen der Kultur zu vermeiden, wurde den Medien 1% Streptomycin/Penicillin (v/v) zugegeben. Medium, die Seren und Penicilline wurden von der Firma Invitrogen (Basel, CH) bezogen.

### 3.1.3 „Kits“

- |                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| ▪ RNA High Pure Isolation Kit    | Roche (Mannheim)  |
| ▪ RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit   | Qiagen (Hilden)   |
| ▪ Omniscript <sup>®</sup> RT Kit | Qiagen (Hilden)   |
| ▪ Taq-DNA-Polymerase             | PeqLab (Erlangen) |

### 3.1.4 Enzyme

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| ▪ Kollagenase Typ II | Cell Systems (Troisdorf)    |
| ▪ Pankreatin         | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| ▪ RNasin             | Promega (Mannheim)          |

### 3.1.5 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

#### 3.1.5.1 Primer für semiquantitative PCR-Analysen

Die Primer für semiquantitative PCR-Analysen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Primer für semiquantitative PCR-Analysen**

Zu amplifizierende Gene, NCBI-Zugriffsschlüssel, Sequenzen der verwendeten forward und reverse Primer, sowie Fragmentgrößen (bp) der Amplifikate

<u>Gen</u>	<u>Primersequenz</u>	<u>Amplifikat (bp)</u>
A1-Rezeptor NM_017155.2	5` TCATTGCCTTGGTCTCTGTG 3` 5` AGTTGTTCCAGCCAAACAT 3`	394
A2a-Rezeptor NM_053294.3	5` GCCGTGTGGATCAACAGTAA 3` 5` AAATTGCAATGATGCCCTTC 3`	295
A2b-Rezeptor NM_017161.1	5` TTCTTTGGGTGTGTCCTTCC 3` 5` TGACAACCTGAATTGGCGTGT 3`	298
A3-Rezeptor NM_012896.2	5` TTCTTGTTTGCCTTGTGCTG 3` 5` CGATGCCAACTGTGAAGGTA 3`	299
c-fos NM_022197.2	5` TCCGAAGGGAAAGGAATAAGA 3` 5` TCCGAAGGGAAAGGAATAAGA 3`	402
Gapdh NM_017008.3	5` CCCTGCATCCACTGGTGTCTGC 3` 5` CATTGAGAGCAATGCCAGCCC 3`	303

### 3.1.5.2 Primer für quantitative Real-Time PCR-Analysen

Die Primer für quantitative RT-PCR-Analysen wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen und sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

**Tabelle 2: Primer für quantitative PCR-Analysen aus Ratten-cDNA**

Zu amplifizierende Gene, NCBI-Zugriffsschlüssel, Sequenzen und Effizienz der verwendeten forward und reverse Primer, sowie Fragmentgrößen (bp) der Amplifikate

<u>Gen</u>	<u>Primer</u>	<u>Amplifikat (bp)</u>	<u>Primer-Effizienz</u>
A1-Rezeptor NM_017155.2	5` GCTCTGCTCGCCATTG 3` 5` CTCTCCAGTCTTGCTCTAC 3`	184	95,3%
Gapdh NM_017008.3	5` GCAAGTTCAACGGCACAG 3` 5` TAGACTCCACGACATACTCAG 3`	135	100,2%

**Tabelle 3: Primer für quantitative PCR-Analysen aus Maus-cDNA**

Zu amplifizierende Gene, NCBI-Zugriffsschlüssel, Sequenzen und Effizienz der verwendeten forward und reverse Primer, sowie Fragmentgrößen (bp) der Amplifikate

<u>Gen</u>	<u>Primer</u>	<u>Amplifikat (bp)</u>	<u>Primer-Effizienz</u>
A1-Rezeptor NM_001008533.2	5` ATCCCTCTCCGGTACAAGACAGT 3` 5` ACTCAGGTTGTTCCAGCCAAAC 3`	119	96,0%
A2a-Rezeptor NM_009630.2	5` CCGAATTCCACTCCGGTACA 3` 5` CAGTTGTTCCAGCCAGCAT 3`	120	104,3%

A2b-Rezeptor NM_007413.4	5` TCTTCCTCGCCTGCTTCGT 3` 5` CCAGTGACCAAACCTTTATACCTG 3`	121	94,0%
A3-Rezeptor NM_009631.3	5` ACTTCTATGCCTGCCTTTTCATGT 3` 5` AACCGTTCTATATCTGACTGTCAGC 3`	126	100,5%
$\alpha$ -MHC NM_010856.4	5` AACTACCACATCTTCTACC 3` 5` TAGTCGTATGGGTTGTTG 3`	85	98,5%
$\beta$ -MHC NM_080728.2	5` GCTGTTATTGCCGCCATTG 3` 5` GTTGTCATTCCGAAGTGTCTTG 3`	135	97,7%
ANF NM_008725.2	5` GGCTCCTTCTCCATCACC 3` 5` CGGCATCTTCTCCTCCAG 3`	150	101,6%
MLC2V NM_010861.3	5` AGATGCTGACCACACAAG 3` 5` GCTCAGTCCTTCTCTTCTC 3`	142	93,9%
Gapdh NM_017008.3	5` CACCCACTCCTCCACCTTTG 3` 5` CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3`	108	95,9%

### 3.1.5.3 Sonden für quantitative TaqMan<sup>®</sup> PCR-Analysen aus Maus-cDNA

Die Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Sonden für quantitative TaqMan<sup>®</sup> PCR-Analysen aus Maus-cDNA  
Zu amplifizierende Gene, NCBI-Zugriffsschlüssel und verwendete TaqMan<sup>®</sup>-Sonden**

<u>Gen</u>	<u>Sonde</u>
CTGF NM_010217.2	Mm01192931_g1
Kollagen1 $\alpha$ 2 NM_007743.2	Mm01165187_m1
TGF $\beta$ NM_011577.1	Mm03024053_m1
TNF $\alpha$ NM_013693.2	Mm00443258_m1
Gapdh NM_008084.2	Mm99999915_g1

### 3.1.6 Größen- und Molekulargewichtsmarker

#### 3.1.6.1 DNA-GrößenStandard

Zur Größenbestimmung doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde der DNA-Marker peqGOLD 100 bp DNA-Leiter der Firma PeqLab (Erlangen) verwendet. Dieser Größenstandard eignet sich, um Fragmente einer Größe zwischen 0,1 und 1 kb zu bestimmen. Der Marker enthält DNA-Fragmente folgender Größen (kb): 1/ 0,9/ 0,8/ 0,7/ 0,6/ 0,5/ 0,4/ 0,3/ 0,2/ 0,1.

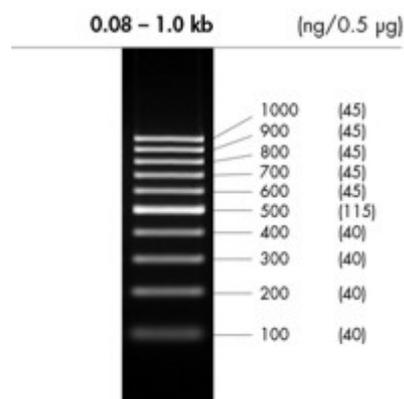


Abb. 6: DNA-GrößenStandard 100 bp DNA Leiter der Firma PeqLab

#### 3.1.6.2 Molekulargewichtsmarker

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde der RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker der Firma GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Dieser Marker enthält Proteine folgender Molekulargewichte (kDa): 225 / 150 / 102 / 76 / 52 / 38 / 31 / 24 / 17 / 12.

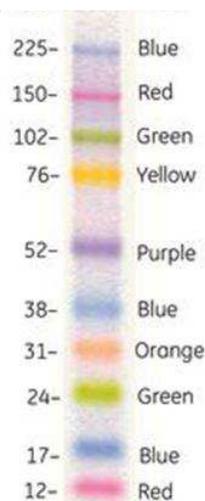


Abb. 7: RPN800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, vorgefärbte Proteinleiter der Firma GE Healthcare

### 3.1.7 Antikörper

#### 3.1.7.1 Primärantikörper zur Immundetektion

Tabelle 5: Primärantikörper zur Immundetektion

Zu detektierende Proteine, deren Molekulargewicht (kDa), verwendete Antikörper und deren Verdünnung

<u>Protein</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
A1-Rezeptor (39 kDa)	Polyklonaler-anti-A1R IgG, Kaninchen (Alpha Diagnostics, Brüssel, BE)	1:1000
A2a-Rezeptor (45 kDa)	Polyklonaler-anti-A2aR IgG, Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg)	1:1000
A2b-Rezeptor (50 kDa)	Polyklonaler-anti-A2bR IgG, Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg)	1:1000
A3-Rezeptor (43 kDa)	Polyklonaler-anti-A3R IgG, Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg)	1:1000
pAKT (60 kDa)	Polyklonaler-anti-pAkt (S473) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
AKT (60 kDa)	Polyklonaler-anti-Akt IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
pERK42/44 (42/44 kDa)	Polyklonaler-anti-pERK42/44 (T202/Y204) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
ERK42/44 (42/44 kDa)	Polyklonaler-anti-ERK42/44 IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
pGSK3β (46 kDa)	Polykonaler-anti- pGSK3-β (S9) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
GSK3β (46 kDa)	Monoklonaler-anti-GSK3-β IgG, Maus (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
pp70S6K (70 kDa)	Polykonaler-anti-pp70S6K (T389) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt am Main)	1:1000
p70S6K (70 kDa)	Polykonaler-anti-p70S6K IgG, Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg)	1:1000
MMP-2 (76/66 kDa)	Polykonaler-anti-MMP-2 IgG, Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)	1:500
MMP-9 (92/86 kDa)	Polykonaler-anti-MMP-9 IgG, Ziege (R&D Systems, Wiesbaden)	1:500
Calsequestrin (54 kDa)	Polykonaler-anti-Calsequestrin IgG, Kaninchen (Dianova, Hamburg)	1:2500

### 3.1.7.2 Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion

**Tabelle 6: Sekundärantikörper zur Immundetektion**  
Spezies, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

<u>Spezies</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Kaninchen	Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:5000
Ziege	Peroxidase-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:5000
Maus	Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:5000

### 3.1.7.3 Primärantikörper zur Immunhistochemie

**Tabelle 7: Primärantikörper zur Immunhistochemie**  
Antigen, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

<u>Antigen</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
α-sarkomerisches Actinin	Monoklonaler anti-α-sarcomerisches Actinin IgG, Maus (Dianova, Hamburg)	1:50
8-Hydroxy-guanosin	Polyklonaler anti-8-Hydroxyguanosin IgG, Ziege (Abcam, Cambridge, UK)	1:300

### 3.1.7.4 Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper zur Immunhistochemie

**Tabelle 8: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper zur Immunhistochemie**  
Spezies, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

<u>Spezies</u>	<u>Fluoreszenzgekoppelter-Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Maus	FITC-konjugierter anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)	1:50
Ziege	TRITC-konjugierter anti-Ziege IgG (Dianova, Hamburg)	1:300

### 3.1.8 Chemikalien und andere Materialien

Allgemeine Laboreinrichtungen, verwendete Maschinen und Arbeitsgeräte entsprechen den in der Molekularbiologie üblichen Anforderungen und sind hier nicht gesondert aufgeführt bzw. im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode erwähnt. Die Materialien, welche für die Durchführung der Arbeit im Speziellen wesentlich waren, sind in folgender Tabelle aufgelistet oder im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode erwähnt. Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad (München)
Agarose	Lonza (Rocklud, USA)
Angiotensin II Acetate Human	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
APS	Serva (Heidelberg)
BSA	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
N6-Cyclopentyladensosin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
E64	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Gelatine	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glucose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
HEPES	Serva (Heidelberg)
Igepal	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Igf-I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-[4,5- <sup>3</sup> H]Leucine	Perkin Elmer (Rodgau-Rüdesheim)
Laminin	Roche (Mannheim)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phenylephrin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt)
PMSF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Prazosin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Sirius Red	Polyscience Inc. (Cham, CH)
Szintillationsflüssigkeit	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.1.9 Computersoftware

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die Programme MS Word Office 2007, MS Power Point 2007, GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Inc., CA, USA), Labworks 3.0 (Labworks Software Inc., CA, USA), Visualsonics Vevo<sup>®</sup>770 Software (Visualsonics Inc., Toronto, CAN), Segment Software (Segment Medviso AB, S), BP 2000 Blood Pressure Analysis System<sup>™</sup> (Visitech Systems, Apex, NC, USA) und Lucia (Nikon, Düsseldorf) verwendet.

### 3.1.10 Statistik

Die experimentellen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM („Standard error of the mean“) dargestellt. Zur statistischen Auswertung der durchgeführten Experimente wurden One-Way-Anova Analysen mit Bonferroni Post-Tests zum Vergleich mehrerer Behandlungsgruppen bzw. ungepaarte T-Tests zum statistischen Vergleich zweier Gruppen verwendet. Die p-Werte sind 2-seitig mit  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,005$ ;  $p < 0,001$ .

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturtechniken

#### 3.2.1.1 Isolation neonataler Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Die Isolation neonataler Kardiomyozyten dient der Herstellung einer Primärkultur, d. h., einer nicht-immortalisierten Zellkultur, die direkt aus dem explantierten Herzen gewonnen wird und nur eine begrenzte Zeit in Kultur gehalten werden kann. Um die

Zellen eines Gewebes für die Zellkultivierung vorzubereiten, müssen diese aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt werden. Dieser, als Verdau bezeichnete Vorgang wird durch ein Zusammenspiel von Pankreatin, welches sich unter Anderem aus Amylasen, Lipasen und verschiedenen Proteasen zusammensetzt, und der Protease Kollagenase, welche das Separieren der kardialen Zellen aus der extrazellulären Matrix bewirkt, katalysiert.

Zur Isolation neonataler Kardiomyozyten wurden 3-5 Tage alte Sprague Dawley Ratten der Firma Charles River GmbH Deutschland verwendet. Um eine für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ausreichende Kardiomyozyten-Dichte zu erzielen, wurden mindestens 10 Herzen pro Isolation verwendet. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitieren mittels einer großen Schere. Der Körper wurde unmittelbar nach der Dekapitation kurz in 70% Ethanol gespült. Zur Entnahme des Herzens wurde ein parasternaler Schnitt in Richtung Diaphragma angelegt und das Herz durch leichten Druck des Daumens auf den Thorax seitlich des Einschnitts herausgedrückt und mit einer kleinen Schere explantiert. Die Herzen wurden zunächst in einer 10-cm<sup>2</sup>-Schale in eiskaltem ADS-Puffer gesammelt und nach Entfernung der Atrien und der großen Gefäße in eine weitere ADS-Puffer gefüllte Schale auf Eis überführt. Nachdem die Herzen durch jeweils etwa 25 Schnitte mit einer Feinschere zerkleinert wurden, wurde der ADS-Puffer abgesaugt. Nach Zugabe von 10 ml Enzym-Mix, welcher die den Verdau induzierenden Enzyme Pankreatin und Kollagenase enthält, wurden die Gewebestücke in eine sterile Flasche überführt und 5 min im Schüttel-Wasserbad bei 90 U/min und 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen. Nach einer weiteren Zugabe von 10 ml Enzym-Mix wurden die Gewebestücke für 20 min erneut unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Der Überstand wurde in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und der durch die Enzyme katalysierte Verdau durch Zugabe von 2 ml NCS (Neonatales Kälberserum) abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 700 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln in weiteren 4 ml NCS gelöst. Die Suspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die beschriebene Prozedur des Gewebeverdaus wurde mit folgenden Inkubationszeiten im Schüttel-Wasserbad wiederholt: 25 min, 25 min, 15 min, 10 min, 10 min. Nach dem letzten 10-minütigen Verdau wurden alle 6 Verdaususpensionen in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und 5 min bei 700 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde ver-

worfen, das Zellpellet in 4 ml Medium durch vorsichtiges Schütteln gelöst und filtriert. Der Filter wurde vor und nach der Filtration der Suspension mit jeweils 1 ml Nährmedium (siehe 3.1.2) gespült, somit ergab sich ein Suspensionsvolumen von 6 ml. Um einen erhöhten Reinheitsgrad der Kardiomyozyten-Kultur zu erlangen, müssen die Herzmuskelzellen von den ebenfalls in der Suspension enthaltenen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen separiert werden. Hierzu macht man sich die Adhäsionseigenschaften dieser Zelltypen zu Nutze, welche im Gegensatz zu Kardiomyozyten auf unbehandelten Plastikoberflächen innerhalb kurzer Zeit adhären. Je 3 ml der Suspension wurden auf eine 6-cm<sup>2</sup>-Schale pipettiert und für 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit den darin enthaltenen Kardiomyozyten in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Mehrmaliges Spülen der Platten mit je 2 ml frischem Medium diente der Aufnahme der größtmöglichen Kardiomyozyten-Anzahl in die Zellsuspension. Nach jedem Spülvorgang wurde der Anteil nicht-adhärenter Zellen auf den beiden Platten mikroskopisch kontrolliert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

<u>ADS-Puffer:</u>	116 mM NaCl
	20 nM HEPES
	0,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5,6 mM Glucose
	5,4 mM KCl
	0,8 mM MgSO <sub>4</sub> (x7H <sub>2</sub> O)

Nach dem Lösen der Substanzen in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,35 eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei 4°C gelagert.

<u>Enzym-Mix:</u>	90 ml ADS-Puffer
	48 mg Pankreatin
	40 mg Kollagenase Typ II

Nach dem Lösen der Enzyme im ADS-Puffer wurde die Lösung filtriert und auf Eis gehalten.

---

<u>Chirurgische Instrumente:</u>	Feinschere (Wecker Spring Scissors, F.S.T., Heidelberg)
	Hautschere (Extra Thin Fine Scissors, F.S.T.)
	Große Schere (Surgical Scissors Sharp, F.S.T.)
	Pinzette (Taylor Forceps, F.S.T.)

#### 3.2.1.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der erhaltenen Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Der Farbstoff Trypanblau wird von Zellen aufgenommen, die keine intakte Membran mehr aufweisen. Somit lassen sich tote Zellen anhand ihrer Blaufärbung mikroskopisch erkennen. Nach einer einminütigen Inkubation wurden 10 µl dieser 1:1 Verdünnung auf eines der eingezeichneten Kreuze einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden jeweils die ungefärbten Zellen der vier Quadranten eines Kreuzes ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung ergab sich aus nachfolgender Formel die Gesamtzellzahl der Suspension.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

#### 3.2.1.2 Kultivierung und Stimulation neonataler Kardiomyozyten für Protein- und RNA-Analysen

Um neonatale Kardiomyozyten zu stimulieren und nachfolgend RNA- und Proteinanalysen durchzuführen, wurden diese zunächst in beschichteten 6-cm<sup>2</sup>-Schalen (Primaria™, Becton Dickinson, Heidelberg) als Monolayerkultur in 3 ml streptomycin-/penicillinhaltigem F10-Nährmedium (siehe 3.1.2) ausgesät. Die Zellzahl, welche mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, betrug pro Platte 1,6x10<sup>6</sup> Zellen. Das Aussäen der angegebenen Zellzahl gewährleistete, dass die Zellen nach einer Adhärenzphase von 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> eine Dichte von etwa 80% erreicht hatten. Waren ausreichende Adhärenz und Kontraktilität der Herzmuskelzellen durch mikroskopische Beurteilung gewährleistet, wurde das Nährmedium durch serumfreies Hungermedium äquivalenten Volumens ersetzt, um eine ausreichende Kompetenz der Zellen für die anschließende Stimulation zu erreichen. Nach 14-18 h Serumentzug wurden die Kardiomyozyten mit PE (Phenylephrin; 1-100 µM), AngII (Angio-

tensin II; 0,1-10  $\mu\text{M}$ ), Igf-I (Insulin-like growth factor; 0,2-20 ng/ml), CPA (N6-Cyclopentyladenosin; 1  $\mu\text{M}$ ) bzw. Prazosin (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Je nach Experiment betrug die Stimulationszeit 30 min bis 24 h. Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt

### **3.2.1.3 Kultivierung neonataler Kardiomyozyten für Radioaktivitätsmethoden**

Um neonatale Kardiomyozyten zu stimulieren und nachfolgend die Inkorporation der radioaktiv-markierten Aminosäure Leucin zu messen, wurden diese in beschichteten 12-Loch-Platten (Primaria™, Becton Dickinson, Heidelberg) als Monolayerkultur in 1 ml Streptomycin-/Penicillin-haltigem F10-Nährmedium ausgesät. Die Zellzahl, welche mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, betrug pro Loch  $2,5 \times 10^5$  Zellen. Die Kardiomyozyten wurden, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, kultiviert und zur nachfolgenden Stimulation vorbereitet.

### **3.2.1.4 Kultivierung und Stimulation neonataler Kardiomyozyten für Immunfärbungen**

Um neonatale Kardiomyozyten zu stimulieren und nachfolgend immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen, wurden diese in sogenannten „Chamber Slides“ (Lab Tek™ Chamber Slide™ System nunc, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe) als Monolayerkultur in 300  $\mu\text{l}$  Streptomycin-/Penicillin-haltigem F10-Nährmedium ausgesät. Unter Berücksichtigung der Adhärenzeigenschaften der Kardiomyozyten mussten die „Chamber Slides“ zunächst beschichtet werden.

Jede Kammer der „Chamber Slides“ wurde für eine Minute mit 200  $\mu\text{l}$  warmer 1%iger Gelatine in PBS überschichtet. Nach vollständigem Absaugen der Gelatine, erfolgte eine dreistündige Inkubation der Kammern mit je 180  $\mu\text{l}$  Laminin [1mg/ml] bei Raumtemperatur. Je  $2,5 \times 10^4$  isolierte neonatale Kardiomyozyten wurden in 300  $\mu\text{l}$  Medium pro Kammer ausgesät. Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Nährmedium durch serumfreies Hungermedium ersetzt. Nach 16 h erfolgte die 48-stündige Stimulation der Zellen mit PE (10  $\mu\text{M}$ ), AngII (1  $\mu\text{M}$ ), Igf-I (20 ng/ml) bzw. CPA (1  $\mu\text{M}$ ). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurden die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit 3,7% Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und nach Überschichtung mit frischem PBS bei 4°C gelagert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt

## 3.2.2 Tiermodelle

### 3.2.2.1 Mauslinie und Tierhaltung

Im Versuch wurden ausschließlich männliche C57/Bl6N Mäuse der Firma Charles River GmbH Deutschland eingesetzt. Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigung gemäß §8 Tierschutzgesetz, Versuch-Nr. 18/2009). Die Tiere wurden je nach Tiermodell in Gruppen von 3-10 Tieren in normierten Makrolonkäfigen oder einzeln in Käfigen mit Hochdeckeln gehalten. Die Stallungen unterlagen einem Lichtregime mit einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Raumtemperatur betrug 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%. Futter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Alleinfuttermittel zur Haltung von Mäusen. Die beschriebene Art der Tierhaltung wird im nachfolgenden als Haltung unter Standardbedingungen bezeichnet.

### 3.2.2.2 Tiermodell zur Induktion pathologischer Hypertrophie in Folge eines Myokardinfarktes in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen

Männliche C57/Bl6 Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden unter Standardbedingungen in Gruppen von 10 Mäusen (Kontrollen) oder einzeln mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining (Läufer) gehalten. Zum Zweck des Ausdauertrainings zur Induktion einer physiologischen Hypertrophie wurden die Käfige mit Nager-Laufrädern ausgestattet. Die absolvierte Laufleistung wurde über das Ablesen der täglichen und der insgesamt zurück gelegten Distanzen auf Tachometern, welche an den Laufrädern angebracht worden waren, kontrolliert und belief sich auf  $4,8 \pm 0,3$  km pro Tag. Nach sechswöchigem freiwilligen Lauftraining bzw. sechswöchiger Haltung unter Standardbedingungen wurde in den körperlich aktiven und körperlich inaktiven Mäusen zum Zwecke der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie ein anterolateraler Myokardinfarkt mittels permanenter LAD („Left anterior descending coronary artery“)-Ligatur induziert. Eigene Vorversuche und frühere Arbeiten zeigten, dass die Überlebensrate der Mäuse nach einer solchen Ligatur bei etwa 80% liegt. Nach Induktion des Myokardinfarktes wurde nach einer kurzen Ruhephase von 5 Tagen das freiwillige Lauftraining der aktiven Mäuse für weitere 4 Wochen fortgesetzt. Die Mäuse erzielten in dieser Phase eine tägliche Laufleistung von  $4,3 \pm 0,2$  km pro Tag. Die Kontrollgruppe wurde in dieser Zeit weiterhin unter Standardbedingungen gehalten.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde der kardiale Phänotyp funktionell, morphologisch, histologisch und biochemisch charakterisiert und mit „sham“-operierten, körperlich aktiven und inaktiven Mäusen, welche die für die Infarktgruppen beschriebene Behandlung durchliefen, verglichen.

### **3.2.2.2.1 Induktion des Myokardinfarktes**

#### Narkoseeinleitung und OP-Vorbereitung der Versuchstiere:

Um die jeweils benötigte Dosis des Narkose- und Schmerzmittels zu bestimmen, wurden die Tiere zunächst gewogen. Zur Anästhesie wurde eine 2:1 Mischung aus Ketavet<sup>®</sup> (100 mg/kg Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Karlsruhe) zur Sedation und Analgesie und Rompun<sup>®</sup> (10 mg/kg Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Berlin) zur Muskelrelaxation in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl eingesetzt. Pro 20 g Körpergewicht wurden 0,3 ml des beschriebenen Narkoseansatzes intraperitoneal appliziert. Dosis und Zusammensetzung der Narkose wurden so gewählt, dass das Tier für eine Dauer von etwa 50 Minuten in tiefer Narkose lag. Dieser Zustand war üblicherweise 15 min nach Narkoseinjektion erreicht. Um ein Austrocknen der Augen während des Eingriffes zu vermeiden, wurden diese mit Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Roche, Mannheim) versehen. Zur Vorbereitung der OP wurde nachfolgend das OP-Feld links des Sternums rasiert. Als Operationstisch diente eine Glasplatte, welche auf einem Heizkissen lag, um eine Hypothermie der Tiere zu vermeiden und deren Körpertemperatur während des Eingriffes konstant zu halten. Glasplatte und Heizkissen wurden unterhalb eines OP-Mikroskops (Nikon SMZ645, Nikon, Düsseldorf) positioniert.

#### Intubation:

Zur Intubation wurde die Maus in Schnüffelposition mittels Fadenschlinge um die Schneidezähne fixiert. Nach seitlicher Positionierung der Zunge mit Hilfe einer gebogenen Pinzette erfolgte, unter direkter Beleuchtung des Larynx durch die Lichtquelle des OP-Mikroskops, die Intubation bei geöffneter Stimmritze. Der Tubus, (eigene Herstellung aus einer 22 gauge Venenverweilkanüle (Venflon<sup>™</sup>Pro Safety, Becton Dickinson, Heidelberg) und einer 18 gauge Kanüle (100 Sterican<sup>®</sup>, Braun, Berlin) wurde mit größter Sorgfalt in die geöffnete Trachea geschoben, um Verletzungen der Luftröhre und der Lunge zu vermeiden. Nach Intubation wurde die Maus in Rückenlage flach auf der Glasplatte positioniert und der Tubus mit dem Y-Stück des tot-raumoptimierten Beatmungsgeräts (Mouse Ventilator MiniVent Typ 845, Hugo Sachs

Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) verbunden. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft mit einem Tidalvolumen von 200  $\mu$ l und einer Atemfrequenz von 120/min. Um während der OP eine stabile Position der Maus und des Tubus zu gewährleisten, wurde das Y-Stück des Ventilators, sowie die 4 Füße der Maus flach auf der Glasplatte aufliegend mit Leukoplaststreifen (Beiersdorf AG, Hamburg) fixiert.

#### LAD-Ligatur:

Vor dem Eingriff wurde das bereits rasierte OP-Feld desinfiziert (Softasept<sup>®</sup> N, Braun, Berlin). Die Haut wurde von subxiphoidal nach axillar mit einer Hautschere im Bereich von etwa 7 mm eröffnet und von der darunter liegenden Faszie und Muskulatur mithilfe zweier Knüpppinzetten befreit. Es erfolgte die stumpfe Präparation des Musculus pectoralis major und des Musculus pectoralis minor, um ein OP-Fenster über dem dritten Intercostalraum (ICR) zu bilden. Durch vorsichtigen Druck einer OP-Pinzette auf die ICR-Muskulatur und abwechselndes Öffnen und Schließen der Pinzette wurden der Musculus intercostalis externus und der Musculus intercostalis internus zwischen der zweiten und dritten Rippe in einer Länge von etwa 3 mm stumpf präpariert. Hierbei ist unbedingt zu beachten, dass keine Irritation von Herz oder Lunge erfolgt und die parallel zum Sternum verlaufende Arteria thoracica interna unbeschädigt bleibt. Die entstandene Öffnung in der ICR-Muskulatur wurde zunächst mithilfe einer Knüpppinzette auf gespreizt und das Perikard durch vorsichtiges Anheben und Zupfen eröffnet. Das entstandene OP-Feld mit freiem Blick auf das linke Herzohr wurde mit Hilfe dreier Fixierfäden offen gehalten und gegebenenfalls durch stumpfes Zupfen der ICR-Muskulatur vergrößert. Da die zu ligierende linke vordere absteigende Koronararterie (LAD) nicht oberflächlich verläuft, musste ein Gewebumschluss mittels Fadenschlinge „blind“ an der Position in der Vorderwand erfolgen, wo die Verzweigung der LAD zu vermuten ist, d. h. etwa 1 mm unterhalb des linken Herzohres. Durch die Biegung der Rundkörpernadel des verwendeten Nahtmaterials war der Radius des umschlungenen Gewebes bereits vordefiniert. Nachdem sich die Herzfrequenz wieder normalisiert hatte, wurde das umschlossene Gewebe mit Hilfe zweier Knoten permanent ligiert. Der Erfolg der Ligatur konnte unmittelbar durch Verblässen des apikal des Knotens gelegenen, von der LAD-versorgten Areal, d. h. durch Induktion der Ischämie, überprüft werden. Nun wurde der ICR mithilfe der Fixierfäden geschlossen. Die Muskulatur wurde mit einer fortlaufenden Naht, der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen. Anschließend wurden 5 mg\*kg des Analgetikums Rimadyl<sup>®</sup> (Pfizer, Karlsruhe) intraperitoneal appliziert, um einen

Schmerzmittelspiegel vor dem Ausschleichen der Narkose aufzubauen. Etwa 10 min nach Extubation setzten die Zwischenzehenreflexe und die Schnurrhaarbewegungen ein und 30-40 min nach Eingriff waren die operierten Tiere bewegungsfähig. Zur postoperativen Beobachtung und Nachsorge wurden die Tiere erst am Folgetag in die Quarantäne der Tierhaltung zurück gebracht und erhielten 22 h nach Eingriff eine weitere Analgetikainjektion.

<u>Analgetikum</u>	Rimadyl® (Pfizer) 15fach verdünnt mit 0,9% NaCl
<u>OP-Besteck</u>	Hautschere (Extra Thin Fine Scissors, F.S.T., Heidelberg) 2 gebogene Pinzetten (Graefe Forceps, F.S.T.) 2 gebogene Knüpfpinzetten (Braun Aesculap, Tuttlingen) Mikro-Nadelhalter (Braun Aesculap) Nadelhalter (BM 365, Braun Aesculap)
<u>Nahtmaterial</u>	Normalöhr, ½ gebogen, Rundkörper (Feuerstein Suprama, Berlin) Federöhr, 3/8 gebogen, Dreikant (Feuerstein Suprama) Seide 6-0, geflochten (Feuerstein Suprama)
<u>Ligatur-Faden</u>	Perma-Hand Seide, 6-0, 3/8 c (Ethicon, Norderstedt)

#### 3.2.2.2 Sham-Operation

Die sogenannte Sham-Operation verlief bis auf das Ausbleiben der Ligatur wie unter 3.2.2.2.1 beschrieben, d. h. nach Durchführen des Ligatur-Fadens durch die links-ventrikuläre Vorderwand wurde der Faden wieder entfernt und der Thorax ohne weitere Manipulation verschlossen.

#### 3.2.2.3 Tiermodell zur Induktion pathologischer Hypertrophie in Folge eines kontinuierlichen maladaptiven Stimulus

Männliche C57/Bl6 Mäuse im Alter von 14 Wochen wurden, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, unter Standardbedingungen in Gruppen von 3 Mäusen gehalten. Die Versuchstiere wurden einer kontinuierlichen Infusion mit dem  $\alpha$ -Adrenorezeptor Agonisten PE (Phenylephrin; 120 mg\*kg\*Tag), mit dem Adenosin-A1-Rezeptor

Agonisten CPA (N6-Cyclopentyladenosin; 2 mg\*kg\*Tag) bzw. einer Kombination aus PE und CPA über subkutan implantierte, osmotische Mini-Pumpen (Alzet<sup>®</sup> Micro-Osmotic Pump, Model 1004, Cupertino, CAN) über einen Zeitraum von 21 Tagen unterzogen. Die verwendeten Pumpen gewährleisteten eine Freisetzung von 0,25 µl der eingefüllten Lösung pro Stunde über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Kontrollgruppe erhielt eine physiologische NaCl-Lösung. Die osmotischen Mini-Pumpen wurden nach Angaben des Herstellers unter sterilen Bedingungen befüllt und anschließend in 0,9%iger NaCl-Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert, um den Osmosevorgang vor Implantation zu aktivieren. Durch diesen Schritt wurde gewährleistet, dass unmittelbar nach Einbau der Pumpe in die Maus die Substanzabgabe definierter Konzentration einsetzte. Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurde der kardiale Phänotyp funktionell, morphologisch, histologisch und biochemisch determiniert.

#### **3.2.2.3.1 Subkutane Implantation osmotischer Mini-Pumpen**

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Plastikkammer mit 3% Isofluran gemischt mit 100% O<sub>2</sub> bei einer Flussrate von 1,0 l/min. Nach Induktion der Narkose wurde die Maus in Bauchlage auf einer Glasplatte, die auf einer Wärmematte platziert worden war, mittels Leukoplast-Streifen fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über Inhalation von 1,5 % Isofluran gemischt mit 100% O<sub>2</sub> bei einer Flussrate von 1,0 l/min über eine mit dem Anästhesie-System verbundene Nasenmaske. Somit war eine stabile Sedierung im Verlauf der Prozedur gewährleistet. Zum subkutanen Einbau der Medikamentenpumpe erfolgte ein etwa 1 cm breiter, transversaler Hautschnitt in Rückenmitte, linksseitig der Wirbelsäule. Danach wurde stumpf und unblutig eine subkutane Tasche bis in die linke Flanke präpariert und zur Spülung 0,5 ml 0,9% NaCl in die Tasche injiziert. Anschließend wurde die Mini-Pumpe mit der permeablen Membran voran in die Hauttasche eingeschoben und der Hautschnitt unter Verwendung nicht resorbierbarer Seide, mit 4-5 Einzelknopfnähten verschlossen. Die Dauer dieses Eingriffs betrug etwa 10 min. Die Tiere waren nach Abnahme der Nasenmaske wach und unmittelbar bewegungsfähig. Zur postoperativen Beobachtung und Nachsorge wurden die Tiere erst 12-18 h nach Eingriff in die Quarantäne der Tierhaltung zurück gebracht.

---

<u>OP-Besteck</u>	Hautschere (Extra Thin Fine Scissors, F.S.T., Heidelberg) 2 gebogene Pinzetten (Graefe Forceps, F.S.T.) Nadelhalter (BM 365, Braun Aesculap, Tuttlingen)
<u>Nahtmaterial</u>	Federöhr, 3/8 gebogen, Dreikant (Feuerstein Suprama) Seide 6-0, schwarz, geflochten (Feuerstein Suprama)

### 3.2.2.3.2 Explantation osmotischer Mini-Pumpen

Zur Explantation der Mini-Pumpen wurden die Mäuse, wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben, narkotisiert und für den Eingriff vorbereitet. Die ursprüngliche Operationsnaht wurde mittels Einmalskalpell (Surgical Disposable Scalpels, Braun) eröffnet und die Mini-Pumpe durch Druckausübung auf das zur Flanke hin gerichtete Ende aus der Hauttasche entfernt. Die Operationsnaht wurde erneut, wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben, verschlossen.

## 3.2.3 *In vivo* Analysen

### 3.2.3.1 Echokardiographie

Die echokardiographische Analyse diente der zweidimensionalen Determination morphologischer Aspekte und der Ermittlung funktioneller Parameter.

#### Narkoseeinleitung und Versuchsvorbereitung:

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Induktionskammer mit 3% Isofluran, gemischt mit 100% O<sub>2</sub> bei einer Durchflussrate von 1,0 l/min. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte nach Positionierung der Maus in Rückenlage auf einer Plattform mit eingebetteten EKG-Elektroden via Inhalation von 1,0 - 1,5% Isofluran gemischt mit 100% O<sub>2</sub> (1,0 l/min) über eine mit dem Anästhesie-System verbundene Nasenmaske. Somit war eine konstante Sedierung im Verlauf der Prozedur gewährleistet und die Herzfrequenz konnte kontrolliert auf etwa 400 Schläge/min gehalten werden. Nach Fixierung der Maus mit allen vier Füßen auf den mit Elektrodengel (Signa Creme, Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA) versehenen EKG-Elektroden, erfolgte unter Verwendung einer Enthaarungscreme (Nair<sup>®</sup>, Church und Dwight, Mississauga, CAN) die Enthaarung im Brustbereich. Die Körpertemperatur wurde während der gesamten Prozedur über eine rektale Temperatursonde überwacht, mit Hilfe der Heizfunktion der Plattform und einer Wärmelampe adjustiert und innerhalb eines Bereichs von 37,0°C±1,5°C konstant gehalten.

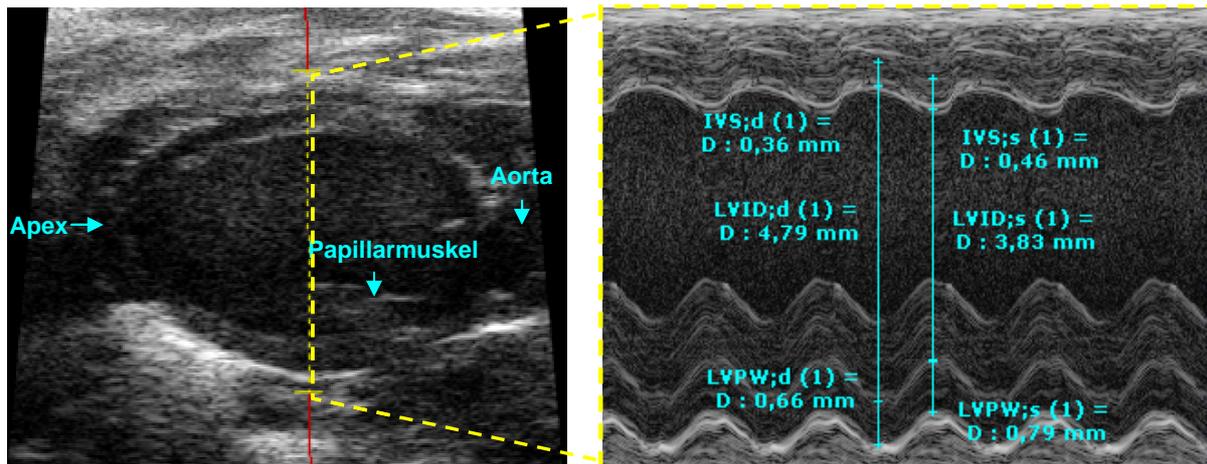
Bildgebung, Messung und Kalkulation morphologischer und funktioneller Parameter:

Die Bildgebung erfolgte mit dem Visualsonics Vevo<sup>®</sup>770 High-Resolution in vivo Micro-Imaging System (Visualsonics Inc., Toronto, CAN) unter Verwendung des Schallkopfs RMV707B (Real-Time Micro Visualization mouse cardiac, 15-45 MHz). Zu Beginn der Untersuchung wurde auf 37°C vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquasonic 100 Ultrasound Transmission Gel, Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA) auf die Brust des Tieres aufgebracht. Zweidimensionale (B-Mode) Bilder wurden in parasternaler Längsachsenprojektion nach Erfassen des Apex und der Aortenwurzel in einer Linie aufgenommen (siehe Abb. 8). In dieser Einstellung erfolgten eindimensionale M-Mode Aufzeichnungen apikal des Papillarmuskels, um in Enddiastole und Endsystole Standardmessungen des interventrikulären Septums (IVS;d/s [mm], diastolisch/systolisch), der linksventrikulären internen Durchmesser in Enddiastole (LVID;d/LVEDD [mm]) und Endsystole (LVID;s/LVESD [mm]) und der linksventrikulären posterioren Wand (LVPW;d/s [mm]; diastolisch/systolisch) durchzuführen (siehe Abb. 8). Linksventrikuläre Kavitätsgrößen und Wanddicken wurden in dieser Projektion bei drei Herzzyklen gemessen und gemittelt. Durch Drehung des Schallkopfs um 90° erhielt man eine Kurzachsenprojektion, um anschließend annähernd mittventrikuläre M-Mode Aufzeichnungen zu erfassen (siehe Abb. 9). In dieser Einstellung erfolgte die Standardmessung der linksventrikulären anterioren Wand (LVAW;d/s [mm]; diastolisch/systolisch) bei drei Herzzyklen. Alle Messungen erfolgten in der Expirationsphase, um Bildartefakte aufgrund der Atembewegung zu minimieren. Die linksventrikuläre Masse (LV Masse [g]) und das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVED vol [μl]), sowie die linksventrikuläre Verkürzungsfraction („Fractional shortening“, FS [%]) wurden von der Visualsonics Vevo<sup>®</sup>770 Software als funktionelle Parameter automatisch unter Verwendung nachfolgender Gleichungen ausgehend von den M-Mode Messungen kalkuliert, wobei die Gewebedichte bei der Maus als 1,05 mg/ml gesetzt wird.

$$LV \text{ Masse [g]} = [1,05 \text{ mg/ml} * [(IVS;d + LVID;d + LVPW;d)^3 - LVID;d^3]]$$

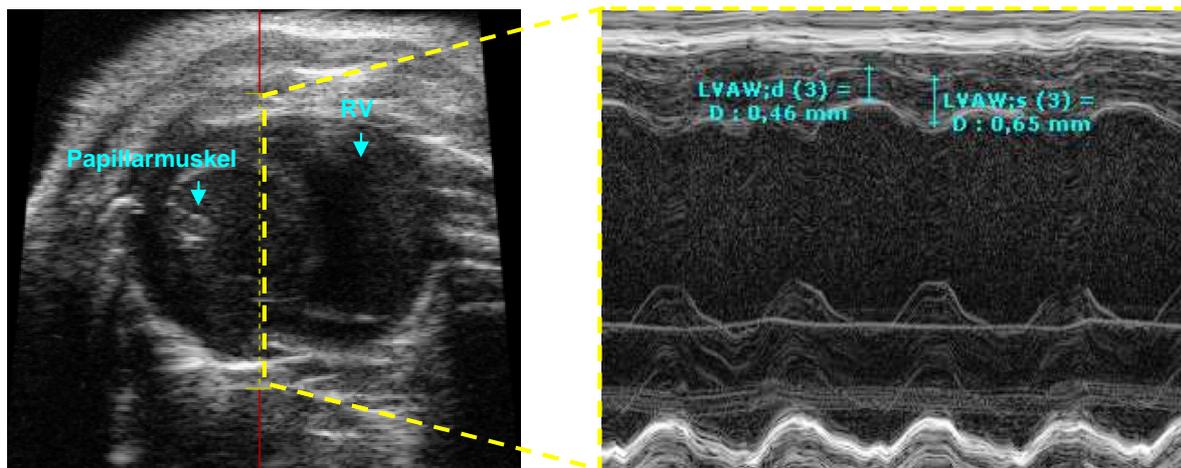
$$FS [\%] = ((LVED \text{ vol} - LVES \text{ vol}) / LVED \text{ vol}) * 100$$

$$LVED \text{ vol } [\mu\text{l}] = ((7,0/2,4 + LVID;d)) * LVID;d^3$$



**Abb. 8: Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung in parasternaler Längsachsenprojektion und zugehörige M-Mode Aufzeichnung einer 14-wöchigen C57/BL6 Wildtyp-Maus**

Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung (links) in parasternaler Längsachsenprojektion einer 14 Wochen alten, männlichen C57/BL6N Maus und zugehörige M-Mode Aufzeichnung (rechts) apikal des Papillarmuskels mit Standardmessungen des IVS, des LVID und der LVPW in Enddiastole und Endsystole. IVS [mm] = Interventrikuläres Septum, LVID [mm] = Linksventrikulärer interner Durchmesser, LVPW [mm] = Linksventrikuläre posteriore Wand, d/s = diastolisch/systolisch



**Abb. 9: Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung in parasternaler Kurzachsenprojektion und zugehörige M-Mode Aufzeichnung einer 14-wöchigen C57/BL6 Wildtyp-Maus**

Echokardiographische B-Mode Aufzeichnung (links) in parasternaler Kurzachsenprojektion einer 14 Wochen alten, männlichen C57/BL6N Maus und zugehörige mittventrikuläre M-Mode Aufzeichnung (rechts) mit Standardmessung der LVAW in Enddiastole (d) und Endsystole (s). LVAW [mm] = Linksventrikuläre anteriore Wand, d/s = diastolisch/systolisch, RV=rechter Ventrikel.

### 3.2.3.2 Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Zweck des Kleintier-MRTs war die funktionelle und morphologische Charakterisierung des kardialen Phänotyps nach Induktion einer physiologischen bzw. pathologischen Hypertrophie in Mäusen. Das MRT ermöglichte eine konsekutive Charakterisierung der Tiere im Verlauf des jeweiligen Versuchs. Die nicht-invasive kardiale

Bildgebung mittels Kleintier-MRT erlaubt - über die echokardiographische Untersuchung hinaus – auch die Beurteilung der rechtsventrikulären Funktion des Herzens. Weiterhin erfolgte aufgrund der Dreidimensionalität der Aufnahmen die Kalkulation der linksventrikulären Volumina mit Hilfe dieses Bildgebungsverfahrens.

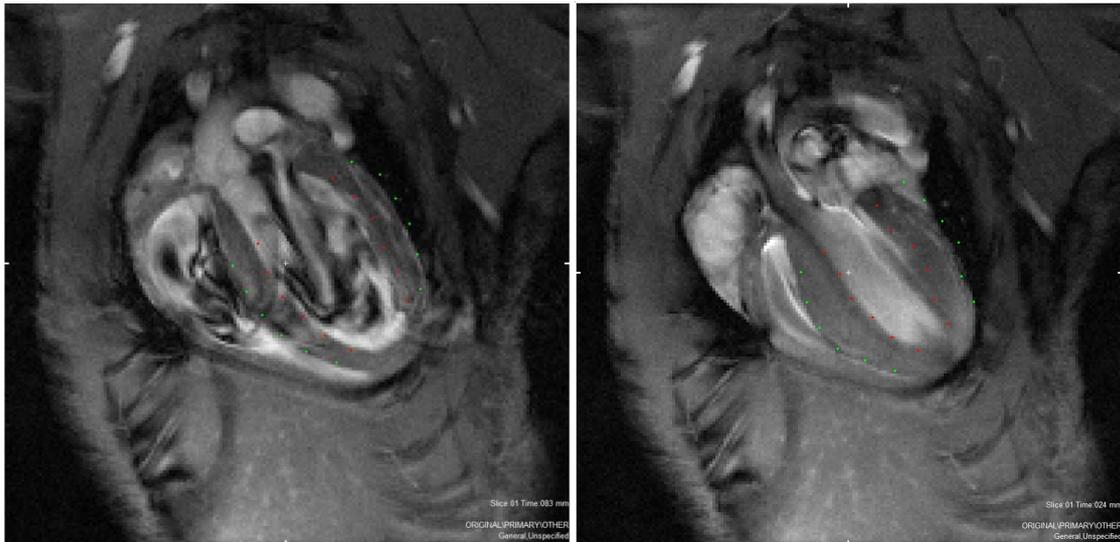
#### Narkoseeinleitung und Versuchsvorbereitung:

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Induktionskammer mit 2-3% Isofluran gemischt mit 100% O<sub>2</sub> bei einer Flussrate von 1,0 l/min. Nach Induktion der Narkose und Aufbringen der Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Roche, Mannheim) auf die Cornea wurde die Maus in Bauchlage auf der aus 4 Elementen (2x2) bestehenden, sattelförmigen Oberflächenspule (Bruker BioSpin, Ettlingen) des Tomographen platziert und mit Klebestreifen (Leukoplast, Beiersdorf AG, Hamburg) fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über Inhalation von 1,0 - 1,5% Isofluran, gemischt mit 100% O<sub>2</sub> (1,0 l/min) über eine mit dem Anästhesie-System verbundene Nasenmaske. Somit war ein konstanter Sedierungslevel im Verlauf der Prozedur gewährleistet, und die Herzfrequenz konnte auf etwa 400 bpm gehalten werden. EKG-Pads (NY3M Red Dot neonatal monitoring electrodes, 3M Health Care, St. Paul, MN, USA) wurden an den Vorderfüßen des Versuchstieres angebracht und mit einem externen EKG (SA Instruments Inc., Stony Brook) verbunden. Ein pneumatischer Sensor (Graseby infant respiration sensor, Smith Medical Germany, Grasbrunn) wurde auf den Thorax aufgelegt, um die Respirationsrate zu kontrollieren. Die physiologischen Daten wurden mit Hilfe eines externen Computers (PC-SAM32, Sa Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA) kontrolliert. Um eine Hypothermie der Maus zu vermeiden, wurde eine mit einem externen Wasserbad verbundene Wärmespule auf dem Rücken der Maus platziert und ebenfalls mit Klebestreifen fixiert. Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Sonde überwacht.

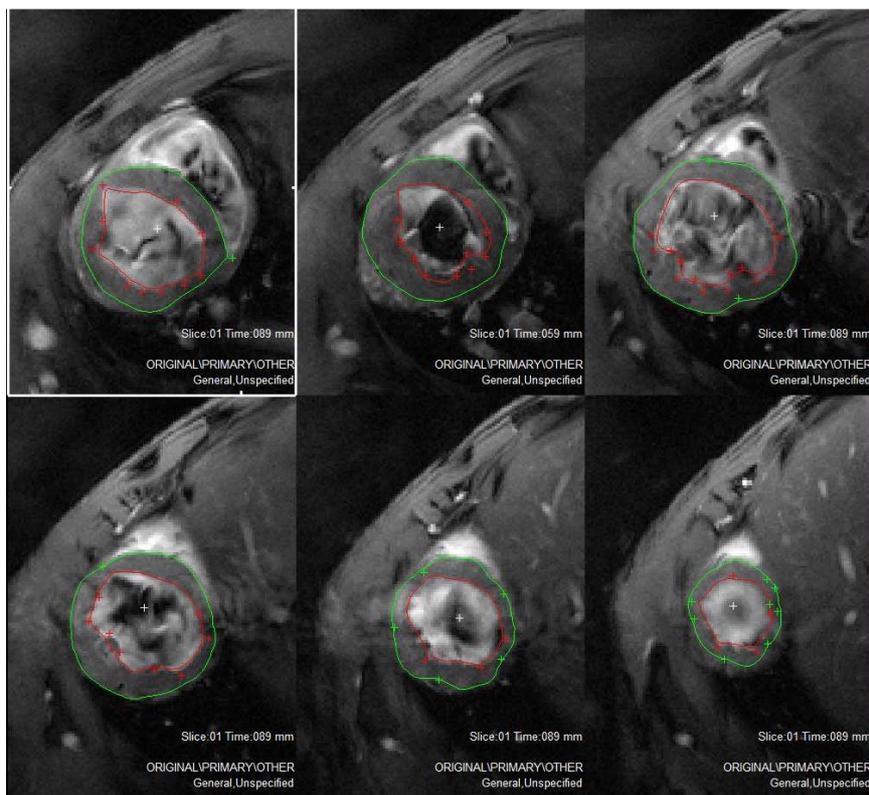
#### Bildgebung und Kalkulation morphologischer, sowie funktioneller Parameter:

Alle Messungen erfolgten mit einem horizontalen 9,4 Tesla Scanner (Biospec advanced II 94/20, Bruker BioSpin, Ettlingen) unter Verwendung eines wassergekühlten Hochleistungs-Gradientensystems (Gradientenstärke: 675 mT/m). Zur kardialen Bildgebung wurden prospektiv getriggerte, cinematographische (Cine) - FLASH (Fast Low Angle Shot)-MRT-Sequenzen verwendet, mit und ohne Unterdrückung des Blutsignals ("Bright blood"-, "Black blood"-Modus). Hierbei hatte das Gesichtsfeld eine Größe von 2x2 cm und die Matrixgröße belief sich auf 192x192 Pixel (1 Pixel = 0,0104 µl). Als TR („Repetition time“)/TE („Echo time“)-Kombination wurde für die

„bright blood“-Darstellung eine Kombination aus 5,9 und 2,0 ms gewählt, für die „black blood“-Darstellung eine Kombination aus 15,0 und 2,0 ms. Ausgehend von einer R-R-Intervalllänge im EKG von etwa 100-200 ms entschied sich, wie viele Movieframes, deren Aufnahmedauer im „bright blood“-Modus jeweils 5,9 ms, im „black blood“-Modus jeweils 15 ms betragen, notwendig waren, um einen gesamten Herzzyklus darzustellen. Pro Tier wurden 7 Projektionen (Übersichtsaufnahme, Referenzscan in 3 Ebenen, 4-Kammer-Blick (siehe Abb. 10), Kurzachsenschnitt, 2-Kammer-Blick) jeweils bei einer Atemfrequenz von 35-50 Zügen/min erfasst. Um die gesamten Ventrikel von der Herzspitze bis zur Klappenebene zu erfassen, waren 5-7 konsekutive Sequenzen im Kurzachsenblick erforderlich. Um die kardiale Funktion beurteilen zu können, wurden die benötigten Bilddateien auf einen externen Computer übertragen. Unter Verwendung der Segment Software (Segment Medviso AB, S) wurden nach Definition von Enddiastole und Endsystole die Konturen von Endokard und Epikard in jeder der 5-7 Sequenzaufnahmen (Schichtdicke: 1 mm) in Kurzachsenprojektion manuell umfahren und das LV Querschnitts-Lumen als die vom Endokard umschlossene Pixelzahl bestimmt (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Anschließend wurde auf Basis der daraus erhaltenen Messwerte enddiastolisches (LVED vol [ $\mu$ l]) und endsystolisches Volumen (LVES vol [ $\mu$ l]), Herzzeitvolumen (HZV [ $\mu$ l]), Schlagvolumen (SV [ $\mu$ l]), LV Masse ([mg], [ml]) und EF ([%]) kalkuliert. Weiterhin erfolgte die Messung der linksventrikulären Wände in allen konsekutiven Sequenzaufnahmen, jeweils während eines gesamten Herzzyklus (R-R-Intervall im EKG), zur Beurteilung der Wanddicken (siehe Abb. 13).

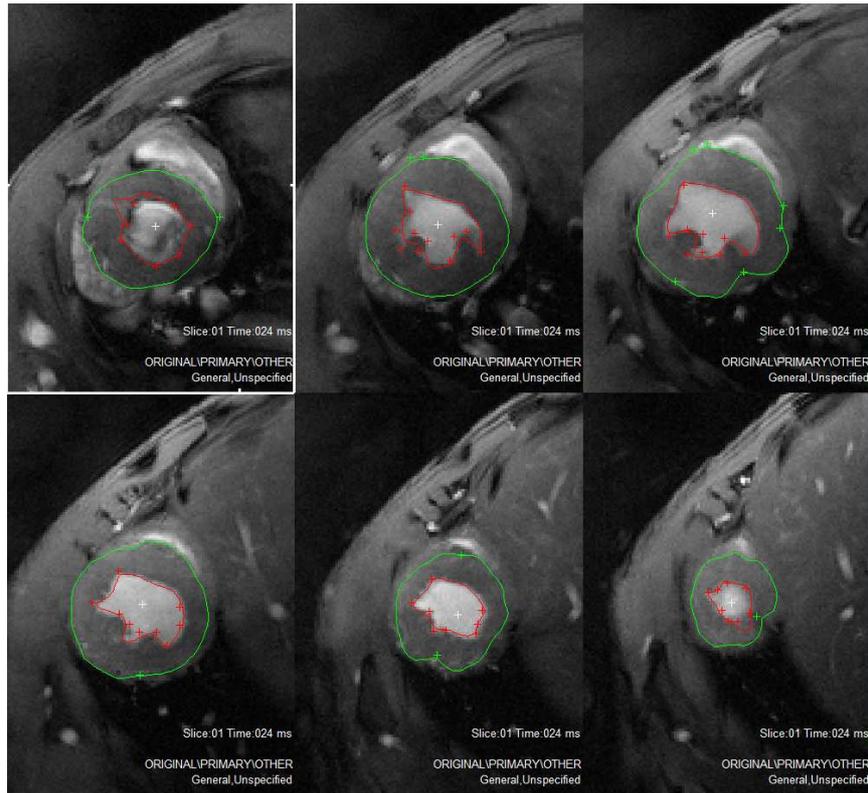


**Abb. 10:** Längsachsenprojektion (4-Kammer-Blick) im „bright blood“-Modus einer 14-wöchigen C57/Bl6 Wildtyp-Maus in der Enddiastole (links) und der Endsystole (rechts)



**Abb. 11:** Kurzachsenprojektion (2-Kammer-Blick) von 6 konsekutiven Sequenzen zur Darstellung des gesamten linken Ventrikels im „bright blood“-Modus einer 14 Wochen alten, männlichen C57/Bl6 Wildtyp-Maus in der Enddiastole

Die Ausmessung des Epikards (grün) und des Endokards (rot) in der Enddiastole diente der Ermittlung des Querschnitts-Lumens (LVED Querschnitts-Lumen) der 6 Sequenzen, um nachfolgend das linksventrikuläre enddiastolische Volumen, das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und die Auswurf fraktion zu kalkulieren.



**Abb. 12: Kurzachsenprojektion (2-Kammer-Blick) von 6 konsekutiven Sequenzen zur Darstellung des gesamten linken Ventrikels im „bright blood“ –Modus einer 14 Wochen alten, männlichen C57/B16 Wildtyp-Maus in der Endsystole**

Die Ausmessung des Epikards (grün) und des Endokards (rot) in der Endsystole diente der Ermittlung des Querschnitts-Lumens (LVES Querschnitts-Lumen) der 6 Sequenzen, um nachfolgend das linksventrikuläre endsystolische Volumen, das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und die Auswurfraction zu kalkulieren.

$$\underline{LVED \text{ Querschnitts-Lumen pro Sequenz } [\mu l]} = (\text{Pixelgröße } (0,0104 \mu l) * \text{Schichtdicke } (1 \text{ mm}) * \text{Pixelzahl des LV-Lumens der Sequenz in der Enddiastole})$$

$$\underline{LVES \text{ Querschnitts-Lumen pro Sequenz } [\mu l]} = (\text{Pixelgröße } (0,0104 \mu l) * \text{Schichtdicke } (1 \text{ mm}) * \text{Pixelzahl des LV-Lumens der Sequenz in der Endsystole})$$

$$\underline{LVED \text{ vol } [\mu l]} = \text{Summe der LVED Querschnitts - Lumen aller Sequenzen}$$

$$\underline{LVES \text{ vol } [\mu l]} = \text{Summe der LVES Querschnitts - Lumen aller Sequenzen}$$

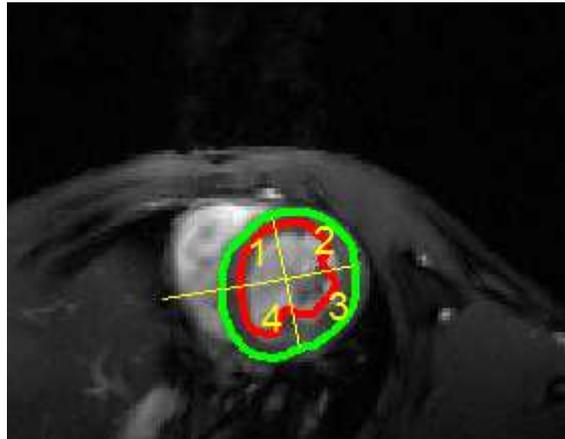
$$\underline{SV [\mu l]} = \sum (\text{LVED Querschnitts-Lumen aller Sequenzen} - \text{LVES Querschnitts-Lumen aller Sequenzen})$$

$$\underline{HZV [\mu l]} = SV * \text{Herzfrequenz}$$

$$\underline{EF [\%]} = (\text{Mittelwert des SV} / \text{Mittelwert der LVED vol}) * 100$$

$$\underline{\text{Myokardiale Masse [mg]}} = (\text{vom Epikard umschlossene Pixelzahl} - \text{Pixelzahl des LV-Volumens für ein gesamtes R-R-Intervall}) * \text{Schichtdicke (1 mm)} * 1,05 \text{ mg/ml}$$

$$\underline{\text{Myokardiale Masse [\mu l]}} = (\text{vom Epikard umschlossene Pixelzahl} - \text{Pixelzahl des LV-Volumens für ein gesamtes R-R-Intervall}) * \text{Schichtdicke (1mm)}$$



**Abb. 13: Einteilung der linksventrikulären Wände in 4 Sektoren**

Die linksventrikulären Wände wurden in 4 Sektoren: Interventrikuläres Septum (1, IVS), linksventrikuläre Hinterwand (2, LVPW), linksventrikuläre Lateralwand (3, LVLW) und linksventrikuläre Vorderwand (4, LVAW) eingeteilt, um Ausdünnung bzw. Verdickung der jeweiligen Wände im Versuch in Folge eines induzierten anterolateralen Myokardinfarktes beurteilen zu können. Die Abgrenzung der Wände ist durch Markierung des Epikards (grün) und des Endokards (rot) dargestellt.

### 3.2.3.3 Blutdruckmessung mittels „Tail-Cuff-Methode“

Die „Tail-Cuff-Methode“ beschreibt eine Art der nicht-invasiven Blutdruckmessung an der Schwanzarterie, die unter Verwendung einer Druckmanschette und eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers die Messung des systolischen, diastolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz, sowie eine Kalkulation des mittleren Blutdrucks ermöglicht. Das zur Blutdruckmessung eingesetzte Gerät (BP 2000 Blood Pressure Analysis System™, Visitech Systems, Apex, NC, USA) erlaubte die simultane Messung von 4 Tieren. Die Mäuse befanden sich während der Prozedur im Wachzustand und wurden durch Positionierung in einer der Körpergröße angepassten Vorrichtung auf der Plattform des Geräts immobilisiert. Um eine Hypothermie der Tiere zu vermeiden und einen optimalen Blutfluss durch den Schwanz der Tiere zu gewährleisten, wurde die Plattform während der Messung konstant auf 36°C geheizt. Der Schwanz des jewei-

ligen Versuchstieres wurde proximal in einer hydraulischen Manschette positioniert, welche mit einem Manometer und einer Aufpumpvorrichtung verbunden war. Jeder Messvorgang mit dem verwendeten Gerät setzt sich aus 2 Phasen zusammen. In der ersten Phase registriert der optosensorische Druckfühler distal der Manschette die Pulsamplitude der Schwanzarterie und überträgt das sinusähnliche Pulssignal auf einen Computerbildschirm. In der zweiten Phase erfolgt die kontinuierliche Druckerhöhung um 5 mmHg/s durch eine mit der Manschette verbundene Pumpe bis zur vollständigen arteriellen Okklusion (Ausbleiben des Pulssignals). Anschließend wird der Manschettendruck allmählich wieder reduziert und in dem Moment, in dem die Pulswelle erstmalig wieder einsetzt, wird der aktuelle Druck auf der Manschette als systolischer Blutdruck gemessen. Bleibt das Pulssignal während der kontinuierlichen Druckabnahme der Manschette erneut aus, ist das Gefäß vollständig relaxiert und der aktuelle Blutdruck wird als diastolischer Druck registriert.

Um die Tiere an die Prozedur zu gewöhnen und stressvermittelte Anstiege von Blutdruck und Puls auszuschließen, wurden jeder Aufzeichnung jeweils 5 Messungen vorangestellt, deren Ergebnisse verworfen wurden. Der Blutdruck wurde durch 2 Messvorgänge bestehend aus jeweils 20 Einzelmessungen ermittelt.

#### **3.2.3.4 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme**

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und erhielten zur Euthanasie pro 20 g Körpergewicht eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml eines unverdünnten Ketavet<sup>®</sup>-Rompun<sup>®</sup>-Narkosegemischs im Verhältnis 2:1 (siehe 3.2.2.2.1). Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde der Thorax durch einen parasternalen Schnitt eröffnet. Mit Hilfe einer 24-gauge-Kanüle (100 Sterican<sup>®</sup>, Braun) erfolgte der Blutentzug aus dem linken Ventrikel. Das Herz wurde explantiert und nach Entfernung der Atrien in eiskaltem PBS-Puffer gespült und gewogen. Aus dem blutleeren Myokard wurde mittventrikulär eine Gewebescheibe der Dicke 1 mm herausgeschnitten und diese, zum Zwecke späterer histologischer Analysen, in 4% Paraformaldehyd überführt. Der übrige Teil des Myokards wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, im Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung für molekularbiologische Methoden bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden Lunge, Leber, Milz und die linke Niere explantiert, im Feuchtzustand gewogen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um am Folgetag die Trockengewichte dieser Organe zu bestimmen. Das Abwiegen der Organe im Feucht- und Trockenzustand diente dazu, eventuell im Behandlungsverlauf ent-

standene Ödeme zu identifizieren und gegebenenfalls Gewichtszunahmen der Organe als Resultat dieser Flüssigkeitseinlagerungen und nicht als Folge der jeweiligen Behandlung zu verifizieren. Die Tibialänge wurde nach Amputation des linken Hinterbeins mit einem Lineal ausgemessen. Anschließend wurde das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht und zur Tibialänge ermittelt.

### **3.2.4 Proteintechniken**

#### **3.2.4.1 Proteinextraktion aus isolierten Kardiomyozyten**

Zur Isolation von Proteinen zu analytischen Zwecken muss der Gesamtzellextrakt gewonnen werden. Hierfür mussten zunächst die in 6-cm<sup>2</sup>-Schalen ausgesäten Kardiomyozyten (siehe 3.2.1.2) geerntet werden. Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Kardiomyozyten nach Zugabe von 160 µl Standard-Lysispuffer (siehe 3.1.1) pro Schale mithilfe eines Zellschabers vollständig von den Platten abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und mehrmaligem Vortexen folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C über 15 min. Das im Überstand befindliche Lysat wurde in ein neues, kaltes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### **3.2.4.2 Proteinextraktion aus dem Myokard**

Zur Proteinisolation aus tierischem Gewebe muss zunächst ein Aufschluss des Gewebes erfolgen. Hierzu wurden die bei -80°C aufbewahrten Herzen zunächst in einen Behälter mit Flüssigstickstoff überführt. Der Gewebeaufschluss erfolgte mechanisch durch Pulverisierung des Gewebes mit Hilfe eines Mörsers. Es ist hierbei unbedingt darauf zu achten, dass durch ständige Zugabe von Flüssigstickstoff eine durchgehende Kühlung von Mörser und Pistill gewährleistet wird und das Herzgewebe nicht auftaut. Zweidrittel des pulverisierten Gewebes wurden in ein kaltes Reaktionsgefäß überführt und nachfolgend zur Proteinextraktion verwendet. Ein Drittel des Gewebepulvers wurde zur RNA-Isolation eingesetzt (siehe 3.2.5.3).

Zur Gesamtproteinextraktion wurde das gefrorene Pulver auf Eis aufgetaut und je nach Pulvermenge mit 300-400 µl Standard-Lysispuffer versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Während dieser Inkubationszeit wurde das Gemisch im Abstand von je 5 min gevortext, um eine ausreichende Lyse des Gewebes zu gewährleisten. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit schloss sich eine 15-minütige

Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C an. Das im Überstand befindliche Gesamtzelllysats wurde in ein neues, kaltes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.4.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteine besitzen aufgrund der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden je 2 µl des Gesamtzelllysats im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt, mit den Reagenzien A und B (DC™ Protein Assay Reagent) der Firma Bio-Rad (München) laut Herstellerangaben versetzt und die OD<sub>280</sub> nach 15-minütiger Inkubation bei RT photometrisch nach Lowry bestimmt. Als Referenzwert diente mit den Reagenzien versetztes H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

### 3.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Unter Gelelektrophorese versteht man generell die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld, in einer Trägermatrix aus Gel, die der Analyse von Makromolekülen dient und eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung ermöglicht. Polyacrylamidgеле entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid und der Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmen die Porengröße des Gels und ihre Polymerisation wird durch APS initiiert. Als Katalysator dient dabei TEMED. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine durch SDS denaturiert und verbinden sich mit SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstanter Masse zu Ladungsverhältnis, welche während ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierbei ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Mobilität des Polypeptids.

In der vorliegenden Arbeit wurde das diskontinuierliche Laemmli-SDS-Gelelektrophorese-System mit Tris-Glycin-Puffern (siehe 3.1.1) zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine verwendet. Die zu untersuchenden Proteine wiesen alle ein Molekulargewicht auf, das eine geeignete Auftrennung in einem 10%igen Trenngel (siehe Tabelle 9) erwarten ließ. Im Versuch wurden jeweils 50 µg Protein mit 5x Protein-Ladepuffer (siehe 3.1.1) versetzt, 3 min bei 95°C gekocht und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Anlegen einer Spannung von 40 V erfolgte die Wan-

derung der Proben durchs Sammelgel von der Anode zur Kathode. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 100 V erhöht, und die Auftrennung erfolgte bis die erste Bande des Größenstandards (siehe 3.1.6.2) das Ende des Trenngels erreicht hatte.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels**

Gelkomponenten	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
1 M Tris-HCL (pH 6,8)		250 µl
1 M Tris-HCL (pH 8,8)	2 ml	
30% Acrylamid/Bis Solution 29:1 (3,3% C) Bio-Rad	2,6 ml	330 µl
10% SDS	75 µl	20 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	3 ml	1,4 ml
10% APS	75 µl	20 µl
TEMED	10 µl	5 µl

### 3.2.4.5 Western-Blot (Immuno-Blot)

Der Western-Blot stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Proteinnachweis dar. Diese verbindet die hohe Trennschärfe der Gelelektrophorese mit der Spezifität der Antikörpererkennung und der Empfindlichkeit von Enzymtests.

Die in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden über 75 min im Wet-Blot-Verfahren durch ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld (300 mA) auf eine PVDF-Trägermembran transferiert. Hierbei gehen die Proteine hydrophobe Wechselwirkungen mit der beschichteten Membran ein und werden so unter Erhaltung des elektrophoretischen Auftrennungsmusters und ihrer Aktivität, sowie Reaktivität auf dieser immobilisiert, wodurch sie sowohl quantitativ, als auch qualitativ mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können.

### 3.2.4.6 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Blotting für 30 min in 5 % Magermilch in TBS-Tween (TBS-T) geblockt, um unspezifische Bindungen der nachfolgend eingesetzten Antikörper zu unterbinden. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte in 5 ml 5%iger Magermilch-Lösung in TBS-T für 2 h bei RT auf einem Schüttler. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Membran 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in 5 ml 5%iger Magermilch in TBS-T gelöst wurde, erfolgte für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase

gekoppelt und ermöglichten so eine auf Chemilumineszenz basierende Antikörper-Detektion mithilfe des ECL<sup>TM</sup>-Kits der Firma GE Healthcare (Freiburg). Die Peroxidase katalysiert die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowie die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, woraus eine Lichtemission der Wellenlänge  $\lambda = 428 \text{ nm}$  resultiert. Diese Emission konnte nun mit Hilfe eines blaulichtempfindlichen ECL<sup>TM</sup>-Films dokumentiert werden. Hierzu wurde die Membran 1 min in den im Verhältnis 1:1 gemischten ECL<sup>TM</sup>-Detektions-Reagenzien 1 und 2 geschwenkt, um anschließend den Film für die jeweils indizierte Zeit zu exponieren und schließlich maschinell zu entwickeln und zu fixieren.

#### **3.2.4.7 Densitrometrische Quantifizierung**

Zur Quantifizierung immunologisch detektierter Proteine wurden die ECL<sup>TM</sup>-Filme eingescannt. Die Ermittlung des Proteinlevels, d. h. der optischen Dichte der jeweiligen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Computersoftware Labworks 3.0. Zur Quantifizierung der Proteine wurde die gemessene optische Dichte des untersuchten Proteins einer bestimmten Probe jeweils durch die optische Dichte des, als Referenz gewählten Proteins Calsequestrin der betreffenden Probe dividiert und gegen die relative Expression des Proteins in der Kontrollgruppe normalisiert.

### **3.2.5 RNA-Techniken**

#### **3.2.5.1 RNA-Extraktion aus isolierten Kardiomyozyten**

Zur RNA-Isolation wurden die in 6-cm<sup>2</sup> Schalen ausgesäten Zellen nach der jeweiligen Stimulationszeit mit kaltem PBS gewaschen, nach Zugabe von 1 ml PBS mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits der Firma Roche (Mannheim), welches einen DNA-Verdau einschließt, nach Herstellerangaben extrahiert, mittels Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) auf Degradation getestet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **3.2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA**

Zur Messung der Nukleinsäurekonzentration wurde die RNA im Verhältnis 1:50 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und die OD<sub>260</sub>, sowie die OD<sub>280</sub> photometrisch bestimmt. Als Referenzwert diente H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>.

### 3.2.5.3 RNA-Extraktion aus dem Myokard

Zur RNA-Extraktion aus tierischem Gewebe muss zunächst ein Gewebeaufschluss, wie unter 3.2.4.1 beschrieben, erfolgen. Das bereits durch Mörsern pulverisierte Herzgewebe wurde nach Zugabe von 1 ml TRI-Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zusätzlich mit Hilfe eines Potter-Homogenisators homogenisiert, 15 min auf Eis inkubiert und mehrmals gevortext. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRI-Reagent<sup>®</sup> erfolgte die RNA-Extraktion mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde mittels Bioanalyzer auf Degradation untersucht. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte mittels Nanodrop (Thermo Scientific, Nidderau)-Messung.

### 3.2.5.4 cDNA-Synthese aus Kardiomyozyten-mRNA

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des Omniscript<sup>®</sup> RT Kits der Firma Qiagen (Reaktionsansatz siehe Tabelle 10) gemäß dem in Tabelle 11 aufgeführten Protokoll. Die Random-Primer wurden von der Firma Roche, der RNase-Inhibitor RNAsin von der Firma Promega (Mannheim) bezogen. Es wurde jeweils 1 µg RNA zur reversen Transkription eingesetzt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes zur reversen Transkription von Kardiomyozyten-mRNA**

Komponente	Volumen
10x RT-Puffer	2,0 µl
10 µM Random-Primer	2,0 µl
10 U/µl RNAsin	1,0 µl
Omniscript <sup>®</sup> RT	1,0 µl
5 mM dNTPs	2,0 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	2,0 µl
1 µg RNA	Ad 10 µl mit RNase-free H <sub>2</sub> O

**Tabelle 11: Protokoll zur reversen Transkription von Kardiomyozyten-mRNA**

Temperatur	Zeit
37°C	1 h
95°C	5 min
Inkubation auf Eis	5 min

### 3.2.5.5 cDNA-Synthese aus Gewebe-mRNA

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kits der Firma Invitrogen (Reaktionsansatz siehe Tabelle 12) gemäß dem in Tabelle 13 aufgeführten Protokoll. Die Random-Primer wurden von der Firma Roche bezogen. Es wurde jeweils 1 µg RNA zur reversen Transkription eingesetzt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung eines 20 µl RT-Ansatzes zur reversen Transkription von Gewebe-mRNA**

Komponente	Volumen
5x RT-Puffer	4,0 µl
10 µM Random-Primer	1,0 µl
0,1 M DTT	2,0 µl
2,5 mM dNTPs	4,0 µl
1 µg RNA	ad 9 µl mit RNase-freiem H <sub>2</sub> O

**Tabelle 13: Protokoll zur reversen Transkription von Gewebe-mRNA**

Temperatur	Zeit
42°C	2 min
Zugabe von 1 µl SuperScript®II RT pro Ansatz	
42°C	50 min
70°C	15 min
4°C	∞

## 3.2.6 DNA-Techniken

### 3.2.6.1 Semiquantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip dieses *in vitro*-Verfahrens ist die enzymatische Vermehrung bestimmter DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von Nukleinsäuren, welche dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation ähnelt. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen (Primern), einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize, der Template-DNA. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei 90-94°C. Im nächsten Schritt, dem Annealing, folgt die Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA. Dann wird in Gegenwart der zur Synthese benötigten dNTPs die Extension der Primer und somit die Amplifikation des dazwischen liegenden Sequenzabschnitts eingeleitet, die bei 72°C durch die Taq-Polymerase erfolgt. Das entscheidende Prinzip der PCR besteht in der zyklischen Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell vervielfältigt wird.

Zur Herstellung des PCR-Ansatzes (Tabelle 14) wurde das Taq-DNA-Polymerase Kit der Firma PeqLab verwendet. Die PCR-Primer stammten von der Firma Eurofins MWG (siehe 3.1.5.1), die dNTPs von der Firma Roche. Die cDNA wurde in einer Konzentration von 250 ng/ $\mu$ l eingesetzt.

**Tabelle 14: Zusammensetzung eines 25  $\mu$ l Ansatzes für semiquantitative PCR-Analysen**

Komponente	Volumen
RNAse-free H <sub>2</sub> O	18,7 $\mu$ l
10x PCR-Puffer	2,5 $\mu$ l
1% DMSO	0,25 $\mu$ l
10 $\mu$ M dNTPs	0,5 $\mu$ l
25 $\mu$ M 5'-Primer	0,2 $\mu$ l
25 $\mu$ M 3'-Primer	0,2 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,15 $\mu$ l
250 ng/ $\mu$ l cDNA	2,5 $\mu$ l

Um Kontaminationen der PCR-Ansätze und somit den Erhalt falscher Amplifikate zu kontrollieren, wurde pro PCR-Reaktion jeweils eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle angesetzt, welche alle in obiger Tabelle genannten Komponenten enthielt, mit Ausnahme der cDNA, stattdessen wurden 2,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hinzu pipettiert.

### 3.2.6.1.1 PCR-Programme für semiquantitative PCR-Analysen

**Tabelle 15: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A1-Rezeptor-, A2a-Rezeptor-, A2b-Rezeptor-, A3-Rezeptor-, c-myc- und Gapdh-codierenden Sequenzen**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	50 s
Annealing	60°C	50 s
Extension	72°C	1min
Abschließende Extension	72°C	10 min

} x 32

**Tabelle 16: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der  $\beta$ -MHC-codierenden Sequenz**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	40 s
Annealing	64°C	40 s
Extension	72°C	40 s
Abschließende Extension	72°C	7 min

} x 26

Tabelle 17: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der  $\alpha$ -MHC-codierenden Sequenz

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	40 s
Annealing	54°C	40 s
Extension	72°C	40 s
Abschließende Extension	72°C	7 min

Tabelle 18: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der c-fos-codierenden Sequenz

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	50 s
Annealing	60°C	50 s
Extension	72°C	1 min
Abschließende Extension	72°C	10 min

### 3.2.6.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierten Fragmente wiesen alle eine Größe auf, die eine optimale elektrophoretische Auftrennung in 2%igen Gelen erwarten ließ. Zur Herstellung der benötigten Gele wurden jeweils 4 g Agarose in 200 ml 1xTAE-Puffer (siehe 3.1.1) eingewogen und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen des Ansatzes auf ca. 50°C wurden 10  $\mu$ l Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ M) hinzu pipettiert und das Gel in eine Flachbettapparatur gegossen. Zur Analyse der Expressionsmuster der amplifizierten Gene wurden je 20  $\mu$ l des Amplifikats mit 5x DNA-Probenpuffer (siehe 3.1.1) versetzt und bei einer Spannung von 60 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die peqGOLD 100 bp DNA-Leiter der Firma PeqLab verwendet (siehe 3.1.6.1). Das im Gel enthaltene, unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert mit dem DNA-Doppelstrang und ermöglicht so die Detektion der DNA-Fragmente.

### 3.2.6.2 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR) beruht auf dem Prinzip des herkömmlichen PCR-Verfahrens, erlaubt aber zusätzlich die Quantifizierung der resultierenden Amplifikate. Die Quantifizierung erfolgt hierbei durch die Messung von Fluoreszenzemissionen (z. B. durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden), die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit („Real-Time“) detektiert werden können. Die Fluoreszenz korreliert mit der Menge des Amplifikats. Der PCR-Verlauf setzt sich aus der linearen, der exponentiellen und der

Plateau-Phase zusammen. Während der linearen Phase ist die Probenmenge begrenzt, wodurch kein Enzym-Substrat-Komplex aus Polymerase, cDNA und Primern gebildet wird, wohingegen in der Plateau-Phase die Menge an DNA, Pyrophosphat und Monophosphatnukleotiden in einem Maße ansteigt, dass eine Hemmung durch diese stattfindet, Produktfragmente häufiger hybridisieren, die Substrate verbraucht werden und Polymerase, sowie Nukleotide denaturieren. Lediglich in der exponentiellen Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, die eine quantifizierbare Amplifikation der DNA erlauben. Um die Fluoreszenzemission zu Beginn der exponentiellen Phase messen zu können, wird ein Schwellenwert („Threshold Cycle“, CT-Wert) gesetzt, der die Zyklenzahl beschreibt, bei welcher die emittierte Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Hierbei korreliert der erste signifikante Anstieg des PCR-Produkts mit der initialen Menge der Target-DNA. Die Anzahl der Templatekopien verhält sich umgekehrt proportional zur Höhe des CT-Werts. Im Versuch wurde jede untersuchte Probe als Triplikat aufgetragen und der CT-Wert durch Mittelwertberechnung der CT-Werte der Triplikate ermittelt. Um eine quantitative Aussage über die Target-Gen-Expression treffen zu können, muss diese gegen die Expression eines Referenzgenes („Housekeeping gene“), in der vorliegenden Arbeit Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), normiert werden. Zur Ermittlung von Genexpressionsunterschieden zwischen unterschiedlich behandelten Proben bzw. unterschiedlichen Behandlungsgruppen erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpression mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (siehe 3.2.6.2.3).

#### **3.2.6.2.1 Quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung interkalierender Farbstoffe**

Bei diesem RT-PCR-Verfahren kommt es zum Einsatz von nicht-sequenzspezifischen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen anhand derer die Amplifikation der zu untersuchenden cDNA verfolgt werden kann. Die Fluoreszenzintensität nimmt hierbei proportional zur Menge der Amplifikate zu. Durch Lichteinstrahlung definierter Wellenlänge wird der an die dsDNA gebundene Farbstoff, in der vorliegenden Arbeit SYBR<sup>®</sup> Green, angeregt. Die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgt zum Abschluss der Elongation in jedem Zyklus. Nachteil dieses RT-PCR-Verfahrens ist die geringe Spezifität, die jedoch mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse nach abgelaufener PCR-Reaktion gesteigert werden kann. Hierbei bewirkt eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (50°C - 95°C) das Aufschmelzen der dsDNA, demzufolge eine Freisetzung des Farbstoffs und somit eine Abnahme des Fluoreszenz-

signals. Die Doppelstrang-DNA spezifischer Amplifikate zeichnet sich durch einen höheren Schmelzpunkt verglichen mit unspezifischen PCR-Produkten oder Primerdimeren aus, wodurch eine Identifikation des PCR-Produkts ermöglicht wird.

### 3.2.6.2.1.1 Ansatz für quantitative Real-Time-PCR-Analysen

Der RT-PCR-Ansatz wurde unter Verwendung des SYBR<sup>®</sup>Green Mastermixes der Firma Bio-Rad, wie in Tabelle 19 beschrieben, pipettiert. Die PCR-Primer stammten von der Firma TIB MOLBIOL (siehe 3.1.5.2). Die cDNA wurde in einer Konzentration von 100 ng/μl eingesetzt.

**Tabelle 19: Zusammensetzung eines 20 μl Ansatzes für quantitative PCR-Analysen**

Komponente	Volumen
RNase-freies H <sub>2</sub> O	4,8 μl
10x SYBR <sup>®</sup> Green Master Mix	10,0 μl
10 μM 5'-Primer	0,6 μl
10 μM 3'-Primer	0,6 μl
100 ng/μl cDNA	4,0 μl

Um Kontaminationen der PCR-Ansätze und somit den Erhalt falscher Amplifikate zu kontrollieren, wurde pro PCR-Reaktion jeweils eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle angesetzt, welche alle in obiger Tabelle genannten Komponenten enthielt, mit Ausnahme der cDNA. Stattdessen wurden 4 μl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hinzu pipettiert.

### 3.2.6.2.1.2 PCR-Programme für quantitative Real-Time-PCR-Analysen

**Tabelle 20: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A1-Rezeptor-, A2b-Rezeptor-, α-MHC-, MLC2V- und ANF-codierenden Sequenzen**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing/Extension	58°C	30 s
		} x 40

**Tabelle 21: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A3-Rezeptor-codierenden Sequenz**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing/Extension	54°C	30 s
		} x 40

Tabelle 22: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der A2a-Rezeptor-codierenden Sequenz

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing/Extension	56°C	30 s

} x 40

Tabelle 23: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der  $\beta$ -MHC- und Gapdh-codierenden Sequenzen

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing/Extension	60°C	30 s

} x 40

### 3.2.6.2.2 Quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan<sup>®</sup>-Sonden

Das TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Verfahren beschreibt ein quantitatives RT-PCR-Verfahren unter Ausnutzung des „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET). Hierbei wird eine sequenzspezifische Sonde verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit einem Quencher, d. h. dem Akzeptor-Fluorochrom und an ihrem 3'-Ende mit einem Reporter, d. h. dem Rezeptor-Fluorochrom markiert wird. Bei Bestrahlung überträgt das angeregte Rezeptor-Fluorophor der intakten TaqMan<sup>®</sup>-Sonde die Energie auf den nahegelegenen Quencher, anstatt Fluoreszenz zu emittieren. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang und die Reporter-Fluoreszenz bleibt weiterhin unterdrückt. Repliziert die Polymerase nun ein Template mit der gebundenen Sonde, spaltet ihre 5'-3'-Exonuclease-Aktivität das 5'-Ende der Sonde und somit das Rezeptor-Fluorochrom ab. Dessen Fluoreszenz wird nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und die Emission kann am Ende der Elongation jedes Zyklus detektiert werden. Da das Abspalten des Quenchers nur nach Hybridisierung der Sonde an die Target-Sequenz erfolgt, zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Spezifität aus.

#### 3.2.6.2.2.1 Ansatz für quantitative TaqMan<sup>®</sup>-Analysen

Der TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Ansatz wurde, wie in Tabelle 24 beschrieben, pipettiert. Reagenzien und verwendete Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen (siehe 3.1.5.3). Die cDNA wurde in einer Konzentration von 200 ng/ $\mu$ l eingesetzt.

Tabelle 24: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes für TaqMan®-Analysen

Komponente	Volumen
RNAse-free H <sub>2</sub> O	12,4 µl
20x TaqMan® Gene Expression Assay	0,6 µl
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	6,0 µl
200 ng/ µl cDNA	1,0 µl

Um Kontaminationen der PCR-Ansätze und somit den Erhalt falscher Amplifikate zu kontrollieren, wurde pro PCR-Reaktion jeweils eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle angesetzt, welche alle in obiger Tabelle genannten Komponenten enthielt, mit Ausnahme der cDNA. Stattdessen wurde 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hinzu pipettiert.

### 3.2.6.2.2 PCR-Programm für quantitative TaqMan®-Analysen

Tabelle 25: TaqMan®-Programm zur quantitativen Amplifikation der TNF-α-, TGF-β-, CTGF-, Kollagen Iα2- und Gapdh-codierenden Sequenzen

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	2 s
Annealing/Extension	60°C	1 min
		} x 40

### 3.2.6.2.3 Relative Quantifizierung der Genexpression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Der  $C_T$ -Wert ist als die Zyklenzahl definiert, bei welcher die emittierte Fluoreszenz der Amplifikats erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Bei Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Quantifizierung der PCR-Amplifikate wird zunächst unter Verwendung nachstehender Gleichung der  $\Delta C_T$ -Wert kalkuliert, d. h. die Expression des Target-Gens gegen die Expression des Referenzgens normiert.

$$\Delta C_T = C_T(\text{Target-Gen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

Der  $\Delta C_T$ -Wert wird für jede zu quantifizierende Probe berechnet. Um relative Expressionsunterschiede des Target-Gens zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen zu ermitteln, muss die relative Genexpression, d. h. der  $\Delta C_T$ -Wert einer der untersuchten Gruppen als „Baseline“ bzw. als Kontrolle gewählt werden und die Genexpression, d. h. der  $\Delta C_T$ -Wert in den übrigen Gruppen mittels nachfolgender Gleichung relativ zu dieser berechnet werden:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Behandlungsgruppe}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle})$$

Um nun die n-fache Expression des Target-Gens in den Behandlungsgruppen in Relation zur Genexpression in der Kontrolle zu kalkulieren, werden im letzten Schritt der relativen Quantifizierung die errechneten  $\Delta\Delta C_T$ -Werte mit Hilfe nachstehender Gleichung in absolute Werte umgerechnet:

$$n\text{-fache Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 3.2.7 Histologische Techniken

#### 3.2.7.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Wie unter 3.2.3.4 beschrieben, wurden mittventrikuläre Gewebeschnitte zur Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Nach der Fixierung wurden die Gewebe aus dem Paraformaldehyd entnommen, jeweils in eine Einbettkassette (Tissue-Tek<sup>®</sup>, Sakura) überführt und über Nacht unter fließendem Wasser gespült. Als nächster Arbeitsschritt schloss sich die Dehydration an, um das Wasser aus dem Gewebe unter Verwendung des in Tabelle 26 aufgeführten Protokolls durch Alkohol und letztendlich durch Paraffin zu ersetzen. Die Entwässerung erfolgte über Nacht in einer automatischen Histokinette.

Tabelle 26: Protokoll zur Dehydration von Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe

Substanz	Zeit
70% Ethanol	1 h
80% Ethanol	1 h
96% Ethanol	1 h
96% Ethanol	1 h
100% Ethanol	3 x 1 h
Xylol	2 x 4 h
Paraffinbad (56°C)	1 h
Paraffinbad (56°C)	2 h

Am Folgetag wurden die Gewebe dem Paraffinbad entnommen, in Metallförmchen gelegt, mit flüssigem Paraffin übergossen und mit dem Unterteil der Einbettkassette zusammen ausgeblockt. Nach Erkalten der Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Microtoms (Leica, Wetzlar) 5 µm dicke Schnitte im Nassschneidverfahren gefertigt, diese wurden im Wasserbad auf Objektträger (Microscope Slides, VWR; Polysine<sup>®</sup>Slides, Thermo Scientific) gezogen und über 48 h im Inkubator bei 60 °C getrocknet.

### 3.2.7.1.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung setzt sich aus zwei Einzelfärbungen zusammen und dient der mikroskopischen Differenzierung unterschiedlicher Strukturen eines Gewebeschnittes. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere die Nuklei mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin färbt alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot, welche vor allem die Zytoplasmaproteine umfassen. Das Anfärben des Zytoplasmas ermöglicht es Zellgrenzen mikroskopisch zu erkennen und somit nachfolgend die Querschnittsfläche bzw. den Durchmesser der angefärbten Zellen, in der vorliegenden Arbeit, der Kardiomyozyten, mit einer geeigneten Computersoftware zu ermitteln. Querschnittsfläche und Durchmesser wurden pro Versuchstier an 50-100 quer-geschnittenen Zellen mit angeschnittenem, annähernd zentral gelegenem Nukleus bei 40-facher Vergrößerung bestimmt (LUCIA G<sup>®</sup> Software, Nikon, Düsseldorf). Hierbei wurde der Zelldurchmesser durch Ausmessen der kürzesten Strecke zwischen zwei sich gegenüberliegenden Zellgrenzen durch den Kern gemessen, die Querschnittsfläche durch Umfahren der Membran und Berechnung der umfahrenen Fläche.

**Tabelle 27: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten**

Substanz	Zeit
Xylol	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 min
90% Isopropanol	2 min
70% Isopropanol	2 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 min
Hämatoxylin nach Ehrlich	20 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
HCL-Alkohol	1 s
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
Fließend bläuen	15 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
Eosin	15 s
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
90% Isopropanol	2 min
100% Isopropanol	2 min
Xylol	3 x 3 min

Nach Ablauf des obigen Färbeprotokolls wurden die Schnitte mit Entellan® (Merck, Darmstadt) luftblasenfrei eingedeckt.

#### Hämatoxylin nach Ehrlich

5% Hämatoxylin (w/v)  
100 ml 96% Isopropanol  
100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
100 ml reinstes Glycerin  
7,5% Kalium-Aluminium-Sulfat (w/v)  
100 ml 96% Isopropanol  
2,5% Eisessig (v/v)

Die Lösung muss nachfolgend lichtgeschützt gelagert werden und 2-4 Wochen bei Raumtemperatur reifen.

#### Eosin gelblich

0,2% Eosin (w/v)  
100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>  
0,02% Eisessig (v/v)

#### HCl-Alkohol

70% Isopropanol (v/v)  
0,1% konzentrierte HCL (v/v)

#### **3.2.7.1.2 Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten**

Bei Sirius Red handelt es sich um einen anionischen Farbstoff, der aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Bindegewebe anfärbt. Im polarisierten Licht stellt diese Färbung eine sehr sensitive Nachweismethode für Kollagen dar, wobei sich große Fibrillen orange-rot, kleine Fibrillen hingegen grün färben. Das Zytoplasma des Gewebes erscheint gelb. Im Versuch wurde aufgrund dieser Farbunterscheidung der linksventrikuläre Kollagengehalt nach Aufnahme von ca. 7 Gesichtsfeldern pro Präparat in 10-facher Vergrößerung mit Hilfe der LUCIA G® Software (Nikon) bestimmt. Der prozentuale Kollagenanteil der ventrikulären Gesamtgewebefläche wurde unter Verwendung nachstehender Gleichung berechnet.

$$\text{Kollagenanteil [\%]} = \text{Kardiomyozyten - Kollagen} / \text{Gesamtgewebefläche} * 100$$

Tabelle 28: Färbeprotokoll der Sirius Red-Färbung von Paraffinschnitten

Substanz	Zeit
70% Xylol	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 min
90% Isopropanol	2 min
70% Isopropanol	2 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	10 min
0,1% Sirius Red-Lösung	60 min
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	spülen
90% Isopropanol	2 min
100% Isopropanol	2 min
70% Xylol	3 x 10 min

Nach Ablauf des obigen Färbeprotokolls wurden die Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) luftblasenfrei eingedeckt.

0,1% Sirius Red-Lösung:

0,1% Sirius Red-Lösung (v/v)

500 ml 1,2% Pikrinsäure (pH 2,0)

Die angesetzte Lösung musste nachfolgend 1 Woche bei Raumtemperatur reifen.

### 3.2.7.1.3 Immunfärbungen von Paraffinschnitten gegen 8-Hydroxy-Diguanosin

8-Hydroxy-Diguanosin (8OHDG), ein oxidiertes Derivat des Nucleosids Guanosin, entsteht in Folge der Generierung DNA-schädigender reaktiver Sauerstoffspezies. Der prozentuale Gehalt der modifizierten Base in den angefärbten Zellen gilt somit als Biomarker für den Stärkegrad oxidativer Schäden von Nucleinsäuren.

Die zu färbenden Paraffinschnitte wurden zunächst durch 30-minütiges Erwärmen auf einer Heizplatte bei 70°C und dreimalige zehnmündige Inkubation in 70%igem Xylol entparaffiniert. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in PBS-Tween für je 5 min wurden diese 1 h in 0,05% Citraconsäure-Anhydrid-Puffer im Wasserbad bei 98°C inkubiert. Nach Abkühlen der Präparate bei RT für 30 min und einem zehnmündigen Waschschrift mit 4xSSC-Tween erfolgte die 48-stündige Inkubation mit dem 1:300 in 4xSSC-Tween verdünnten Primärantikörper gegen 8-Hydroxy-Diguanosin (8OHDG, Abcam, Cambridge, UK) in einer feuchten Kammer bei 4°C. Daran schloss

sich eine 6-stündige Inkubation der feuchten Kammer im Wasserbad bei 37°C. Im Anschluss an ein dreimaliges Waschen mit 4xSSC für je 5 min wurden die Präparate mit dem 1:30 in 4xSSC verdünnten Sekundärantikörper (anti-goat-IgG-TRITC, Dianova) für 40 min in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde tropfenweise DAPI-mounting Medium (Vectashield, Peterborough, UK) auf den Objektträger gegeben und dieser mit einem Deckglas bedeckt. Die Präparate wurden dann bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Zur prozentualen Ermittlung des 8OHDG-Gehalts in Kardiomyozyten und in nicht-kardiomyozytären Herzzellen eines mittventrikulären Paraffinschnittes wurden pro Präparat 15 Gesichtsfelder in 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion aufgenommen, wobei ein Gesichtsfeld eine Fläche von 0,00153664 mm<sup>2</sup> umfasste. Nach Auszählung der Zellkerne und der Kardiomyozyten in den Gesichtsfeldern erfolgte die Ermittlung der 8OHDG-Fluoreszenzsignale in den Herzmuskelzellen und den übrigen Zelltypen. Die Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten erfolgte anhand der Eigenfluoreszenz der Sarkomere erstgenannter Zelltypen. Anschließend wurde anhand der erhaltenen Werte die Zahl der Nuklei und der Myozyten pro 1 mm<sup>2</sup> kalkuliert. Unter Verwendung nachstehender Gleichungen ergab sich dann die Anzahl an Fluoreszenzsignalen für Kardiomyozyten bzw. für die übrigen Zelltypen:

$$\text{Anzahl der 8OHDG-Signale in Kardiomyozyten pro mm}^2 = \text{Anzahl der 8OHDG-Signale in Kardiomyozyten in 15 Gesichtsfeldern} / (0,00153664 \text{ mm}^2 * 15)$$

$$\text{Anzahl der 8OHDG-Signale in Nicht-Kardiomyozyten pro mm}^2 = \text{Anzahl der 8OHDG-Signale in Nicht-Kardiomyozyten in 15 Gesichtsfeldern} / (0,00153664 \text{ mm}^2 * 15)$$

$$\text{8OHDG-Gehalt in Kardiomyozyten in \%} = (\text{8OHDG-Signale in Kardiomyozyten pro mm}^2 / \text{Kardiomyozyten pro mm}^2) * 100$$

$$\text{8OHDG-Gehalt in Nicht-Kardiomyozyten in \%} = (\text{8OHDG-Signale in Kardiomyozyten pro mm}^2 / \text{Kardiomyozyten pro mm}^2) * 100$$

---

<u>Citraconsäure-Anhydrid-Puffer (pH 7,4):</u>	0,05% Citraconsäure Anhydrid (v/v) 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<u>SSC-Puffer (20x; pH 7,0):</u>	3 M NaCl 0,3 M tri-Na-Citrat 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
<u>SSC-Tween-Puffer (4x):</u>	4x SSC-Puffer 0,5% Tween20 (v/v)

### **3.2.7.2 Immunfärbung isolierter Kardiomyozyten gegen $\alpha$ -sarkomerisches Actinin**

Die Immunfärbung gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Actinin mittels Fluoreszenz-markiertem Antikörper dient zum Einen der Darstellung der Z-Linien des Sarkomers der Kardiomyozyten, was eine optische Beurteilung der Organisation des kontraktiven Apparats erlaubt, zum Anderen ermöglicht die Färbung die mikroskopische Ausmessung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche, da die Eigenfluoreszenz der Zellen verstärkt wird und somit Zellgrenzen erkennbar werden.

Die in „chamber slides“ fixierten Kardiomyozyten (siehe 3.2.1.4) wurden durch Zugabe von 0,001% Triton in PBS für 1 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,5% BSA in PBS für 30 min geblockt. Die Inkubation mit dem 1:50 in 1,5% BSA in PBS verdünnten Primärantikörper gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Actinin (Dianova, Hamburg) erfolgte für 2 h bei 37°C in einer feuchten Kammer. An ein dreimaliges Waschen mit 0,1% Igepal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in PBS schloss sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (FITC-konjugierter anti-Maus IgG, Dianova) für 1 h bei 37°C in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer an. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:50 Verdünnung in 0,5% BSA und 0,1% Igepal in PBS eingesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die „Chamber“ nach Angaben des Herstellers auseinandergebaut und Überreste der Waschlösung mit Hilfe einer Vakuumpumpe entfernt. Nachfolgend wurde DAPI-mounting Medium (Vectashield, Peterborough, UK), mit dessen Hilfe die Nuklei blau angefärbt wurden, tropfenweise zwischen die Kammern gegeben und der Objektträger mit einem Deckglas bedeckt. Die Objektträger wurden dann bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die fluoreszenzmikroskopische Be-

urteilung der Organisation der durch Anregung des FITC-markierten Antikörpers grün erscheinenden Z-Linien erfolgte in 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion bei je 50-100 Zellen dreier unabhängiger Experimente. Zur Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche wurden 50-100 Zellen je zweier Stimulationsansätze pro Probe in 2 unabhängigen Experimenten in 40-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe der LUCIA G<sup>®</sup> Software (Nikon) ausgemessen.

### **3.2.8 Radioaktivitätsmethoden**

#### **3.2.8.1 [<sup>3</sup>H]-Leucin-Inkorporation**

Die Verwendung radioaktiv markierter Substanzen ermöglicht es die zelluläre Aufnahme der jeweiligen Substanz unter definierten Bedingungen zu bestimmen. Der durch ein Isotop markierte Stoff wird von den Zellen entweder durch zelluläre Transporter oder durch Diffusion in das Zytoplasma aufgenommen und dort nachfolgend metabolisiert oder gespeichert. Die von den kompetenten Zellen abgegebene Strahlung ist detektierbar und ermöglicht eine Aussage über die Quantität der aufgenommenen Substanz. Bei der Aminosäure Leucin handelt es sich um eine proteinogene Aminosäure. Die Inkorporation von Tritium-markiertem Leucin gilt als Maß für die Proteinbiosyntheserate, welche schließlich durch Zerfälle des Isotops pro Minute quantifiziert werden kann.

Zur Durchführung des Versuchs wurden die in 12-Loch-Platten ausgesäten Kardiomyozyten (siehe 3.2.1.3) für 14-16 h in serumfreiem Hungermedium gehalten. Nach Zugabe von 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Leucin pro ml Medium pro Loch wurden die Zellen für 24 h mit PE (10 µM), AngII (1 µM), Igf-I (20 ng/ml) bzw. CPA (1 µM) stimuliert. Nach der angegebenen Behandlungsdauer wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und zur Fixierung mit 10% Trichloracetat über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit SDS-NaOH (1 N) über 1 h im Inkubator lysiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Lysats in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit jeweils 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) versetzt. Die Zerfälle pro Minute („counts per minute“, cpm), als Maß für die Menge des inkorporierten Tritium-markierten Leucins, wurden nachfolgend im β-Counter (Wallac Model 1409 Scintillation Counter, Wallac) gemessen. Alle Arbeiten wurden im Überwachungsbereich unter Berücksichtigung des Strahlenschutzgesetzes durchgeführt.

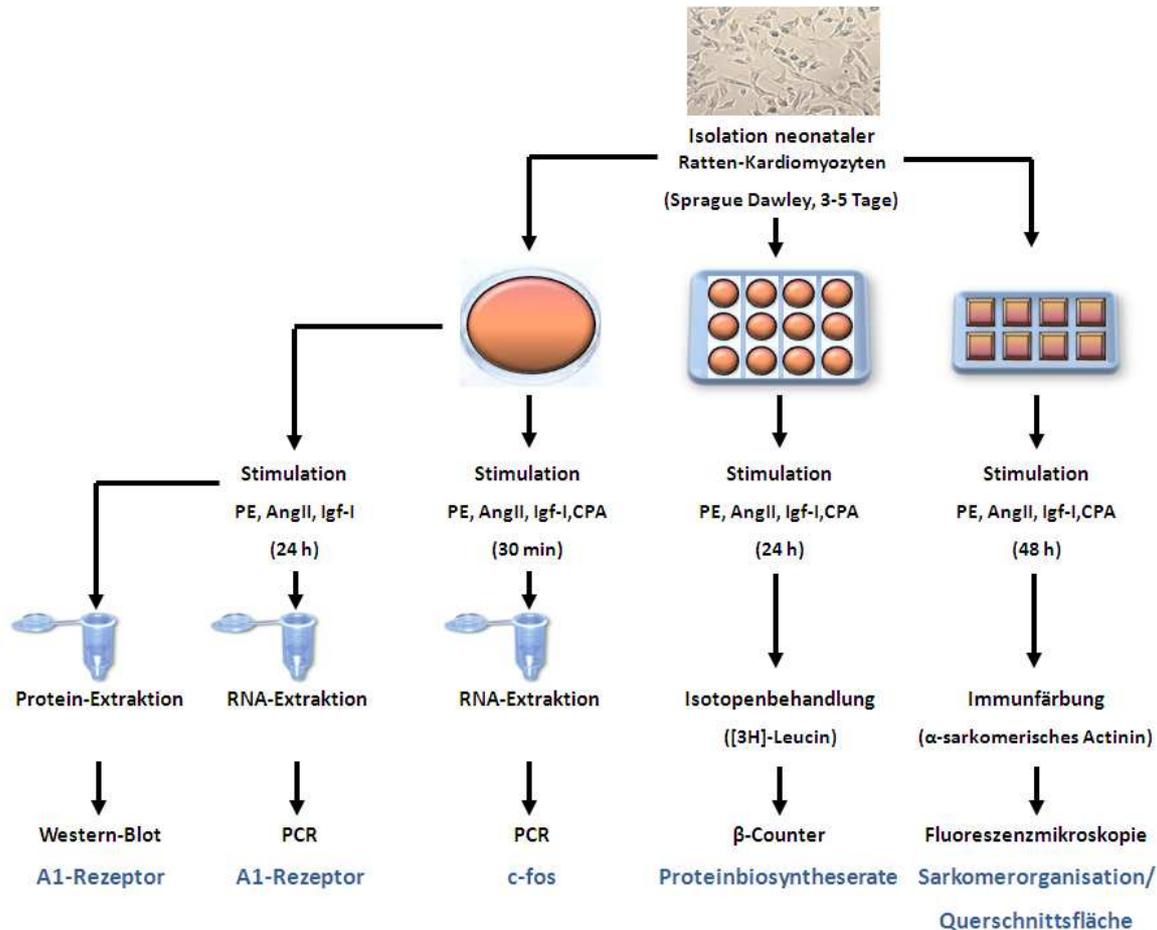
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Hypertrophie-Induktion *in vitro*

Dem Autakoid Adenosin werden unter Anderem anti-inflammatorische und anti-hypertrophe Wirkungen zugeschrieben. Bisher ist das Zusammenspiel der zahlreichen Komponenten des Adenosin-Systems zur Auslösung der protektiven Mechanismen noch weitestgehend unklar. Die Hemmung der Hypertrophie scheint Adenosin jedoch hauptsächlich über die Stimulation von A1-Rezeptoren zu vermitteln. Dies wurde unter anderem von Liao und Kollegen beobachtet, die den A1-Rezeptor als potenten Mediator Adenosin-induzierter anti-hypertropher Effekte im Mausmodell identifizierten (Liao et al., 2003). Um die Rolle des Adenosin-A1-Rezeptors bei der Entwicklung des maladaptiven Phänotyps bzw. des Remodeling-Prozesses zu untersuchen, sollte zunächst Funktion und Expression des Rezeptors im Zuge der hypertrophen Antwort in isolierten neonatalen Kardiomyozyten charakterisiert werden.

#### 4.1.1 Das experimentelle System

Isolierte Kardiomyozyten neonataler Sprague Dawley Ratten (3-5 Tage alt) wurden mit Phenylephrin (PE), einem  $\alpha_1$ -adrenergen Agonisten als Mediator der Hypertrophie *in vitro*, mit Angiotensin II (AngII) als nicht-adrenergem pro-hypertrophen Stimulus oder mit Igf-I (Insulin-like growth factor I), als Mediator der physiologischen Hypertrophie, behandelt. Diese Experimente erfolgten in der Abwesenheit oder Gegenwart des selektiven Adenosin-A1-Rezeptor-Agonisten N6-Cyclopentyladenosin (CPA; im Folgenden auch als A1-Agonist bezeichnet). Wie in Abb. 14 dargestellt, wurde der durch die Behandlungen induzierte Phänotyp anhand Charakteristika hypertropher Myozyten determiniert. Der Expressionsstatus des Adenosin-A1-Rezeptors (im Folgenden als A1-Rezeptor bezeichnet) wurde auf RNA- und Proteinebene bestimmt.



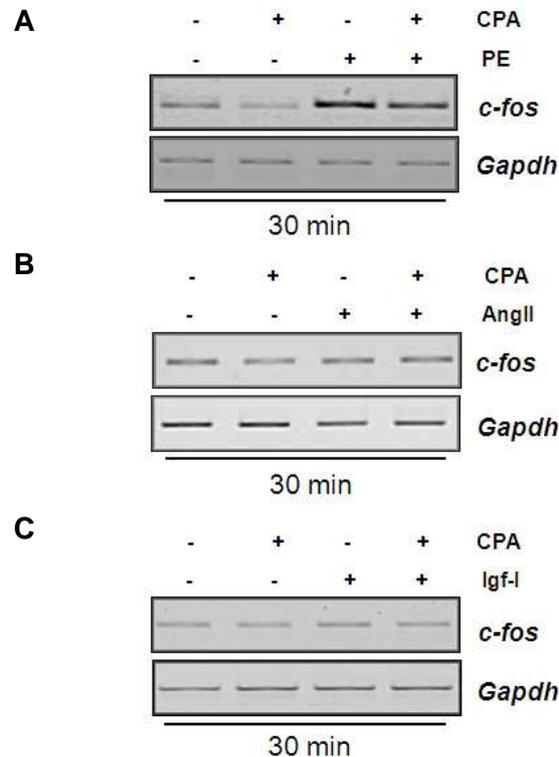
**Abb. 14: Methodisches Vorgehen zur Analyse des Einflusses einer A1-Rezeptor-Aktivierung auf den kardiomyozytären Phänotyp infolge pro-hypertropher Stimulation**

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden isoliert, in 6cm<sup>2</sup>-Schalen, 12-Lochplatten oder „chamber slides“ ausgesät und kultiviert. Nach einer Adhärenzphase von 48 h erfolgte die Stimulation der Zellen mit Standardkonzentrationen von PE (10 µM), AngII (1 µM) oder Igf-I (20 ng/ml) in An- und Abwesenheit des selektiven A1-Rezeptor-Agonisten CPA (1 µM). Die Stimulationsdauer betrug, abhängig vom zu untersuchenden Hypertrophie-Marker, 30 min (Expressionsstatus von c-fos), 24 h (Proteinbiosyntheserate) oder 48 h (Sarkomerorganisation, Kardiomyozyten-Querschnittsfläche). Der Expressionsstatus von c-fos wurde in einer semiquantitativen RT-PCR detektiert. Die Bestimmung der Zerfälle pro Minute, als Maß für die Proteinbiosyntheserate, nach [<sup>3</sup>H]-Leucin-Behandlung erfolgte in einem β-Counter. Sarkomerorganisation und Querschnittsfläche wurden nach Immunfärbung gegen α-sarkomerisches Actinin im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Expressionsstatus des A1-Rezeptors wurde auf mRNA- und Proteinebene unter 24-stündiger Behandlung mit steigenden Konzentrationen der pro-hypertrophen Stimuli (PE: 1; 10; 100 µM/ AngII: 0,1; 1; 10 µM/ Igf-I: 0,2; 2; 20 ng/ml) determiniert. CPA=6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; AngII=Angiotensin II; Igf-I=Insulin-like growth factor I

#### 4.1.2 Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der hypertrophen Antwort in neonatalen Kardiomyozyten

Ziel der Analyse war es, den Einfluss einer selektiven A1-Rezeptor-Aktivierung durch CPA auf den PE-, AngII- und Igf-I –induzierten zellulären Phänotyp anhand von Charakteristika hypertropher Kardiomyozyten zu untersuchen.

In Folge hypertropher Stimulation wird charakteristischerweise bereits 30 Minuten nach Applikation des Stimulus als erste zelluläre Antwort die Transkription des molekularen Hypertrophie-Markers *c-fos* herauf reguliert.



**Abb. 15: A1-Rezeptor-Aktivierung hemmt die PE-induzierte Transkriptionssteigerung des immediate early Gens *c-fos***

Nach 30-minütiger Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit (A) PE (10 μM), (B) AngII (1 μM) oder (C) Igf-I (20 ng/ml) in An- und Abwesenheit des A1-Agonisten CPA (1 μM) bzw. mit CPA alleine (1 μM) wurde *c-fos* in einer semiquantitativen PCR amplifiziert. Als PCR-Kontrolle diente *Gapdh*. Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte in 2%igen Agarosegelen (n=3). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; AngII=Angiotensin II; Igf-I=Insulin-like growth factor-I

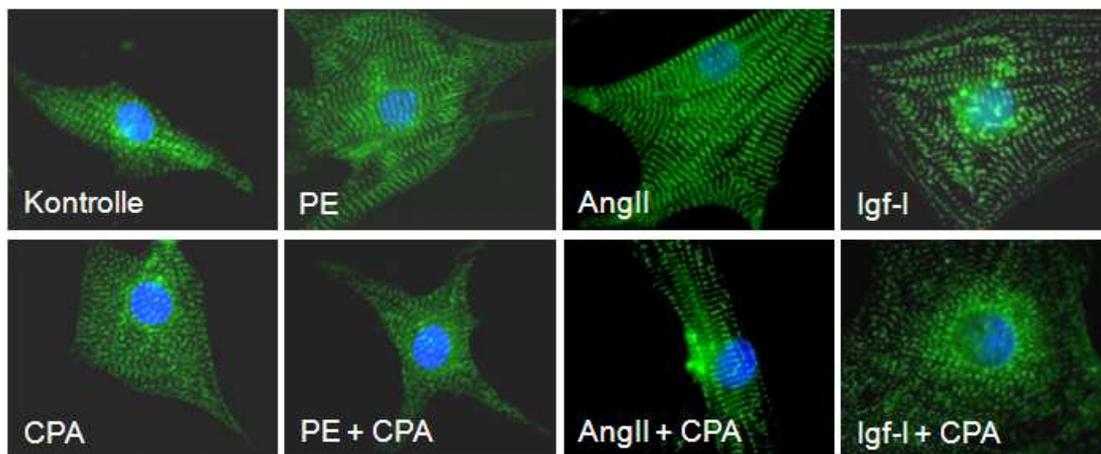
Die in Abb. 15 dargestellten Expressionsmuster von *c-fos* zeigen, dass eine Stimulation des  $\alpha$ -Adrenorezeptors mit PE zu einer deutlichen Transkriptionssteigerung des molekularen Hypertrophie-Markers führte, wohingegen Behandlungen mit AngII und Igf-I keine solche Modulation der Expression bewirkten. Die durch PE ausgelöste *c-fos* Stimulierung schien durch simultane A1-Aktivierung mit CPA partiell inhibiert zu werden. Der A1-Agonist alleine schien eine leichte Reduktion des Transkriptionsstatus von *c-fos* zu bewirken. Eine A1-Aktivierung könnte also protektiv wirken.

Im weiteren Verlauf wurden die vorrangigen Merkmale hypertropher Myozyten - die Zunahme ihrer Querschnittsfläche und die gesteigerte Proteinsyntheserate - im Modell untersucht.



Wie in Abb. 16 gezeigt, konnte die PE-, nicht aber die AngII- oder Igf-I-vermittelte Vergrößerung der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche nach 48-stündiger Stimulation durch gleichzeitige Aktivierung des A1-Rezeptors gehemmt werden. Der A1-Agonismus per se besaß keinen Einfluss auf die Kardiomyozyten-Querschnittsfläche. Weiterhin führten, verglichen mit unbehandelten oder CPA-behandelten Zellen, 24-stündige Stimulationen mit PE und AngII zu einer deutlichen Zunahme der Proteinsynthese. Eine simultane A1-Aktivierung resultierte in der Inhibierung des PE-, nicht aber des AngII-induzierten pro-hypertrophen Effekts. Der adaptive Stimulus Igf-I zeigte keinen Einfluss auf die Proteinsyntheserate.

Charakteristisch für die gesteigerte Proteinsynthese hypertropher Kardiomyozyten sind die anormale Modulation im Gehalt sarkomerischer Proteine und die daraus resultierende Zunahme der Sarkomerorganisation.



**Abb. 17: A1-Rezeptor-Aktivierung hemmt die PE-, nicht aber die AngII- oder Igf-I-vermittelte Zunahme der kardiomyozytären Sarkomerorganisation**

Nach 48-stündiger Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit PE (10  $\mu$ M), AngII (1  $\mu$ M) oder Igf-I (20 ng/ml) in Ab- (oberer Bildreihe, repräsentative Beispiele) und Anwesenheit (untere Bildreihe, repräsentative Beispiele) von CPA (1  $\mu$ M) bzw. mit CPA alleine (1  $\mu$ M) wurden die Zellen einer FITC-gekoppelten Immunfärbung gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Actinin unterzogen und die Sarkomerorganisation mikroskopisch in 100-facher Vergrößerung beurteilt. Die Nuklei der Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. Unstimulierte Kardiomyozyten dienten als Kontrolle (n=2, mit je 50-100 Zellen je zweier Stimulationsansätze pro Agens). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; AngII=Angiotensin II; Igf-I=Insulin-like growth factor I

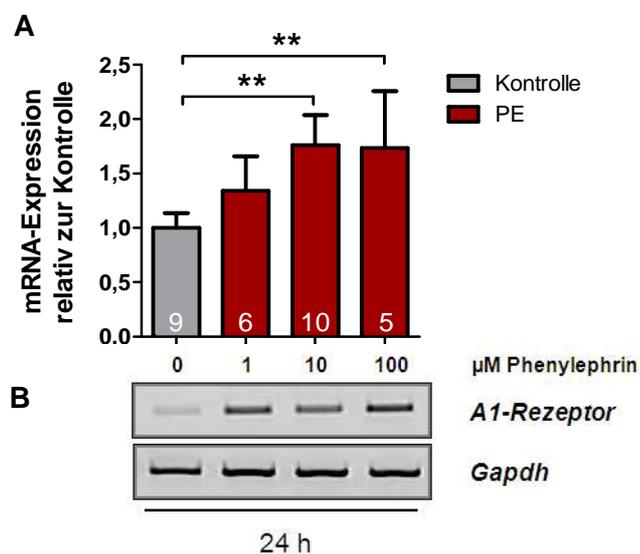
Der durch die Zunahme der Sarkomerorganisation verifizierte hypertrophe Phänotyp war unter Stimulation mit allen verwendeten hypertrophen Substanzen nach 48 h evident. Ein simultaner A1-Rezeptor-Agonismus resultierte in einer sichtbaren Abschwächung des PE-vermittelten Effekts, wohingegen der AngII- und der Igf-I-

induzierte hypertrophe Phänotyp weitestgehend unbeeinflusst von einer A1-Aktivierung blieben. CPA alleine zeigte keinen Effekt auf die Sarkomerorganisation.

Zusammengefasst zeigen die unter 4.1.2 dargestellten Ergebnisse, dass eine selektive A1-Rezeptor-Aktivierung die PE-induzierte Zunahme der c-fos Transkription, des Kardiomyozyten-Durchmessers, der Proteinbiosyntheserate und der Sarkomerorganisation inhibierte. Die durch AngII und Igf-I herauf regulierten Hypertrophie-Marker unterlagen keiner Modulation durch den A1-Agonisten. Somit scheint eine Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors spezifisch der  $\alpha_1$ -adrenergen Signaltransduktion zur Induktion der Kardiomyozyten-Hypertrophie entgegenzuwirken.

#### 4.1.3 Expressionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation in neonatalen Kardiomyozyten

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob die PE-induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie von einer Modulation der Adenosin-A1-Rezeptor-Expression begleitet wird. Um dies zu prüfen, wurde die mRNA-Expression des Rezeptors unter PE-Behandlung steigender Konzentration untersucht.

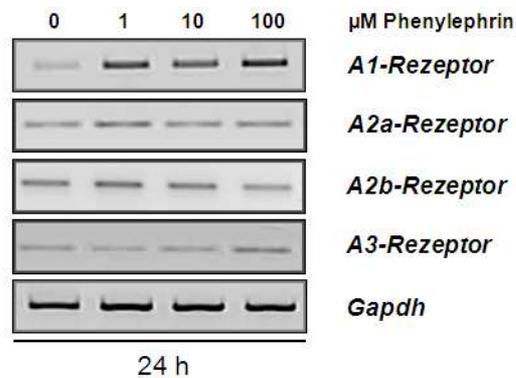


**Abb. 18: Die mRNA-Expression des A1-Rezeptors unterliegt einer Heraufregulation durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation**

Nach 24-stündiger Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit steigenden PE-Konzentrationen (1; 10; 100  $\mu$ M) wurde der A1-Rezeptor in (A) quantitativen RT- und (B) semiquantitativen PCR-Analysen amplifiziert. Die Expression des Rezeptors wurde in der quantitativen Analyse gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression unstimulierter Zellen (Kontrolle) gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Stimulationsansätze dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Ungepaarter T-Test). (B) Repräsentative Amplifikate der semiquantitativen PCR, elektrophoretisch in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Expressionskontrolle diente Gapdh (n=3).

Abb. 18 zeigt, dass eine Behandlung isolierter Kardiomyozyten mit 10  $\mu\text{M}$  PE, entsprechend der üblich eingesetzten Standardkonzentration des pro-hypertrophen Agens, und eine PE-Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  in einer deutlichen mRNA-Expressionszunahme des A1-Rezeptors resultierte. Aber auch sehr niedrige Dosen des Stimulus (1  $\mu\text{M}$ ) bewirkten bereits eine tendenzielle Transkriptionssteigerung.

Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete PE-abhängige A1-Expressionssteigerung von einer transkriptionellen Heraufregulation des gesamten Adenosinrezeptor-Systems begleitet wird, wurden nachfolgend die mRNA-Expressionsmuster der übrigen Adenosinrezeptor-Subtypen A2a, A2b und A3 unter Behandlung steigender PE-Konzentrationen untersucht.

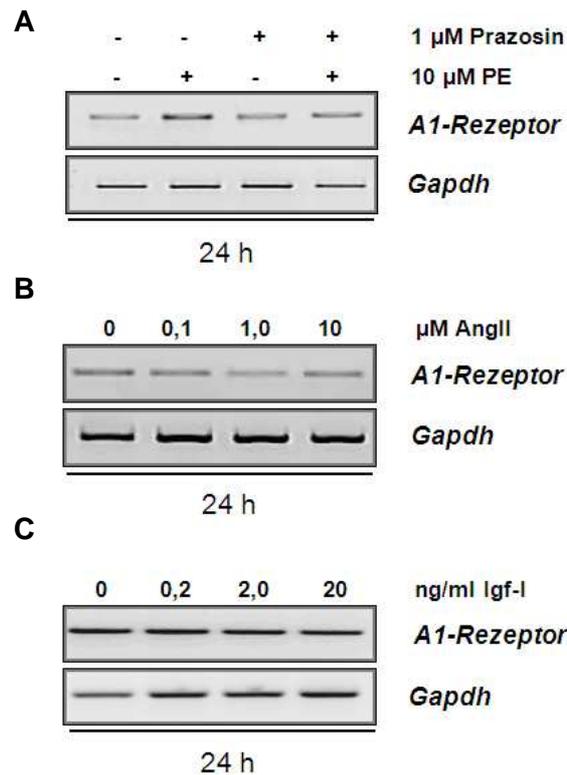


**Abb. 19: Die mRNA-Expression der Adenosinrezeptor-Subtypen A2a, A2b und A3 unterliegt keiner Regulation durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation**

Nach 24-stündiger Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit steigenden PE-Konzentrationen (1; 10; 100  $\mu\text{M}$ ), wurde die Expression der Adenosinrezeptor-Subtypen A1, A2a, A2b und A3 in semiquantitativen PCR-Analysen untersucht. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Amplifikate wurden elektrophoretisch in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Expressionskontrolle diente Gapdh (n=3).

Die in Abb. 19 dargestellten repräsentativen Agarosegele semiquantitativer PCR-Analysen zeigen, dass die Adenosinrezeptoren A2a, A2b und A3, unabhängig von der Höhe der eingesetzten PE-Konzentration, im Gegensatz zum A1-Subtyp, keiner PE-abhängigen Regulation unterlagen. Diese Beobachtung weist somit auf eine A1-spezifische PE-vermittelte transkriptionelle Regulation hin.

Um nun zu verifizieren, dass bei der beobachteten Expressions-Regulation des A1-Rezeptors ein Effekt vorliegt, der tatsächlich auf  $\alpha$ -adrenerge Stimulation zurückzuführen ist, wurde die mRNA-Expression des Rezeptors unter 24-stündiger Behandlung mit PE in An- und Abwesenheit des  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Antagonisten Prazosin, sowie mit steigenden Konzentrationen der hypertrophen Stimuli AngII und Igf-I untersucht.

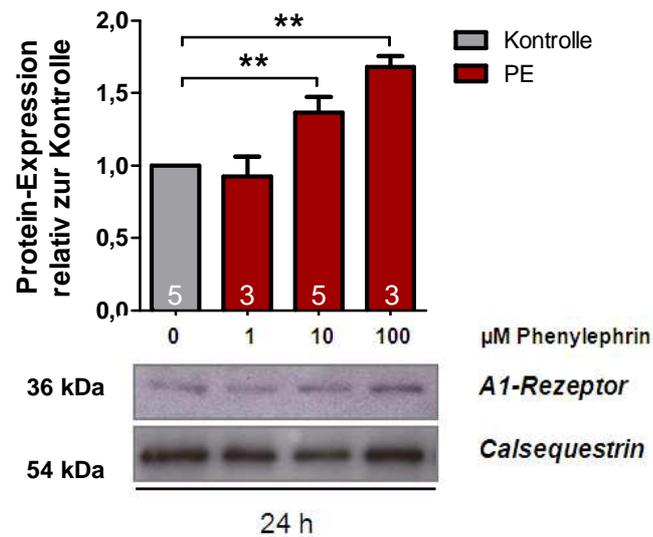


**Abb. 20: Die mRNA-Expressionszunahme des A1-Rezeptors ist spezifisch für  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation**

Nach 24-stündiger Stimulation isolierter Kardiomyozyten mit (A) PE (10  $\mu$ M), Prazosin (1  $\mu$ M) bzw. einer Kombination der beiden Agentien und mit steigenden Konzentration von (B) AngII (0,1; 1; 10  $\mu$ M) bzw. (C) Igf-I (0,2; 2; 20 ng/ml) wurde der A1-Rezeptor in semiquantitativen PCR-Analysen amplifiziert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Amplifikate wurden elektrophoretisch in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Expressionskontrolle diente Gapdh (n=3). PE=Phenylephrin; AngII=Angiotensin II; Igf-I=Insulin-like growth factor I

Abb. 20 indiziert, dass eine Co-Stimulation PE-behandelter Herzmuskelzellen mit dem  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Blocker Prazosin die Abschwächung der PE-induzierten A1-Expressionszunahme bewirkte. Des Weiteren gaben Behandlungen mit steigenden Konzentrationen von AngII und Igf-I keinen Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation des Rezeptors. Diese Beobachtungen legen nun die Vermutung nahe, dass es sich bei der demonstrierten Expressionssteigerung des A1-Rezeptor-codierenden Gens um einen für  $\alpha$ -adrenerge Stimulation spezifischen Effekt handelt.

Nachfolgend sollte nun geprüft werden, ob die spezifische PE-abhängige Expressionsregulation des A1-Rezeptors auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene nachgewiesen werden kann.



**Abb. 21: Die Protein-Expression des A1-Rezeptors unterliegt einer Dosis-abhängigen Heraufregulation durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus PE**

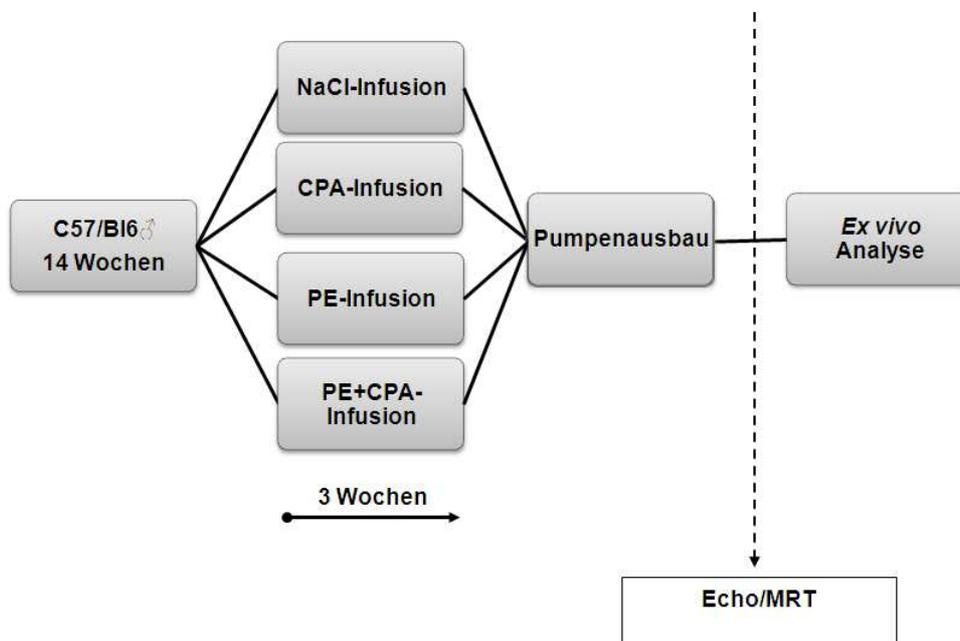
Nach 24-stündiger Stimulation neonataler Kardiomyozyten mit steigenden PE-Konzentrationen (1; 10; 100  $\mu\text{M}$ ) wurde die Expression des A1-Rezeptors im Western-Blot detektiert. Pro Probe wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein in 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt. Als Expressionskontrolle diente Calsequestrin. Die Proteinbanden dreier Western-Blots wurden densitometriert, die A1-Rezeptor-Expression gegen die Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression unstimulierter Zellen (Kontrolle) gesetzt (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n Stimulationsansätzen (siehe Zahlen in den Balken); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Ungepaarter T-Test).

Abb. 21 demonstriert, dass die Protein-Expression des A1-Rezeptors durch 24 h Behandlung mit dem hypertrophen Stimulus PE stimuliert wurde.

Zusammengefasst zeigen die unter 4.1 dargestellten Ergebnisse, dass  $\alpha$ -adrenerge Rezeptor-Stimulation durch PE zur spezifischen transkriptionellen und translationalen Heraufregulation des Adenosin-A1-Rezeptor-Subtyps führte, wohingegen Stimulation der AngII- und Igf-I-Rezeptoren keinen vergleichbaren Effekt bewirkte. Da eine selektive A1-Aktivierung der PE-vermittelten pro-hypertrophen Antwort entgegenwirkte, könnte dies auf einen Rückkopplungs-Mechanismus hinweisen, über den Adenosin die kardiale Hypertrophie in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation antagonisiert.

## 4.2 Untersuchungen zur Funktion und Expression des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge $\alpha$ -adrenerger Stimulation *in vivo*

Die A1-Aktivierung konnte der PE-vermittelten Kardiomyozyten-Hypertrophie *in vitro* entgegenwirken. Um dies nun auch *in vivo* zu verifizieren, wurde der Effekt einer kontinuierlichen A1-Aktivierung auf den PE-induzierten hypertrophen Phänotyp in Mäusen untersucht. Darüber hinaus sollte in diesem Modell die Hypothese geprüft werden, ob über den A1-Rezeptor ausgelöste kardioprotektive Effekte mit einer Inhibition der Fibrose und der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9 assoziiert sind. Hierbei sollte weiterhin untersucht werden, ob der Rezeptor die maladaptive Antwort durch Aktivierung adaptiver Kinasen, wie AKT und P70S6K, als Komponenten des PI3K-Signalwegs, und/oder Regulation von ERK vermittelt. Außerdem sollte der Einfluss des Rezeptors auf den negativen Regulator der Hypertrophie, GSK3 $\beta$ , determiniert werden. Weiterhin sollte die Frage nach einer PE-abhängigen Modulation des Adenosinrezeptor-Systems in diesem Mausmodell geklärt werden (Abb. 22).

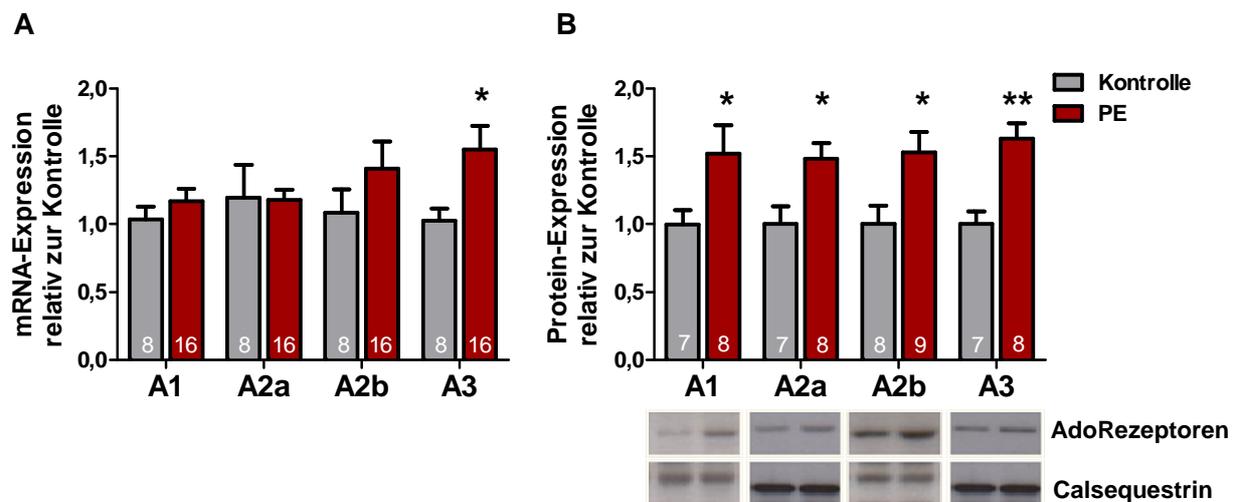


**Abb. 22: Studiendesign zur funktionellen und expressionellen Analyse des A1-Rezeptors im Zuge  $\alpha_1$ -adrenerg induzierter Hypertrophie im Mausmodell**

Männliche C57/Bl6N Mäuse im Alter von 14 Wochen wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und erhielten entweder eine 0,9%ige NaCl-Infusion (Kontrolle), eine kontinuierliche CPA-Behandlung (CPA; 2 mg\*kg\*Tag) oder eine PE-Infusion (PE; 120 mg\*kg\*Tag) in Ab- und Anwesenheit von CPA (PE+CPA) über subkutan implantierte, osmotische Minipumpen über eine Dauer von 3 Wochen. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Pumpen explantiert und die Tiere mit MRT und Echokardiographie untersucht. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere getötet. Nach Organentnahme erfolgte die biochemische und histologische Determinierung des kardialen Phänotyps, sowie die Expressionsanalyse der MMP-2 und -9 und der Adenosinrezeptoren.

#### 4.2.1 Expressionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors in Folge hypertropher Stimulation *in vivo*

Zunächst sollte die Expression des Adenosinrezeptor-Systems in Abhängigkeit einer kontinuierlichen PE-Behandlung im oben beschriebenen Mausmodell untersucht werden. Hierzu wurde die Expression der Adenosinrezeptor-Subtypen A1, A2a, A2b und A3 nach 3-wöchiger NaCl-Infusion (Kontrolle) bzw. PE-Behandlung (PE) auf mRNA- und Proteinebene determiniert.



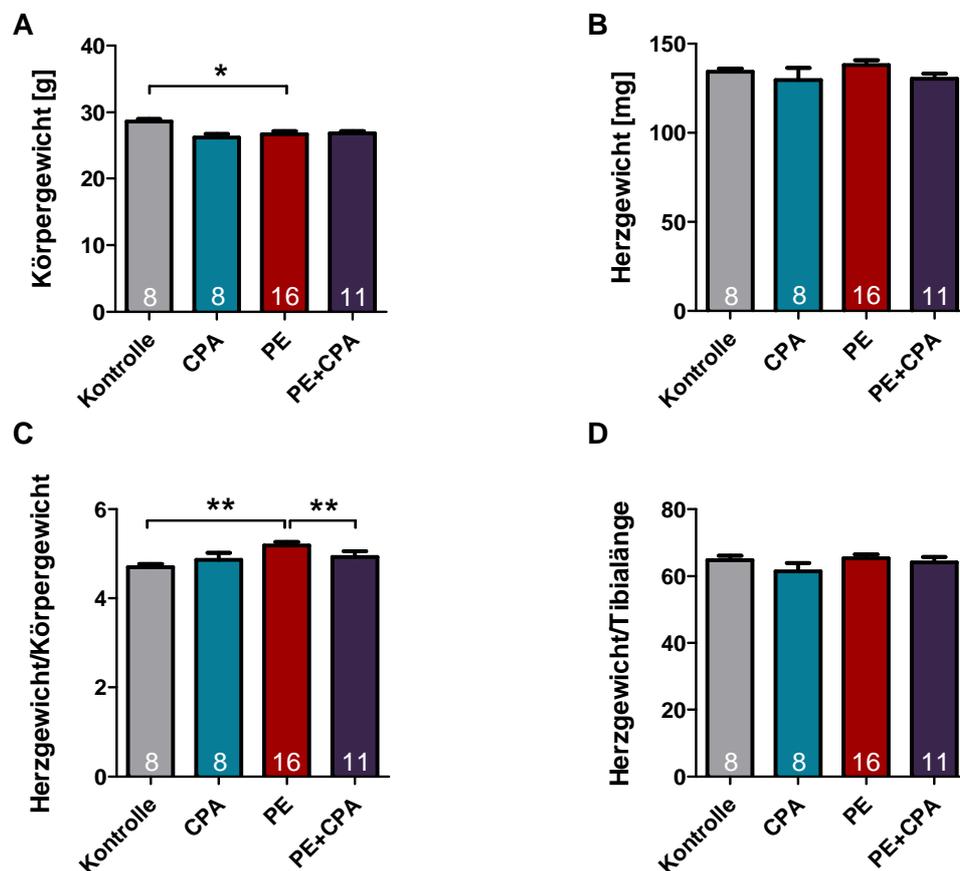
**Abb. 23: Kontinuierliche  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation im Mausmodell führt zur Expressionszunahme des gesamten Adenosinrezeptor-Systems auf Proteinebene**

Männliche C57/Bl6N Mäuse im Alter von 14 Wochen erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle) bzw. mit PE (120 mg\*kg\*Tag). Nach Behandlung wurde die Expression der Adenosinrezeptor-Subtypen A1, A2a, A2b und A3 mittels (A) quantitativer RT-PCR und (B) Western-Blot untersucht. (A) Die mRNA-Expression der Rezeptoren unter PE-Behandlung wurde gegen die Gapdh-Expression normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression der Kontrollgruppe gesetzt. (B) Die Proteinbanden (repräsentative Beispiele unterhalb des Diagramms) zweier Western-Blots wurden densitometrisch quantifiziert, die jeweilige Rezeptor-Expression unter PE-Behandlung gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur Expression in der Kontrollgruppe gesetzt (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus der Untersuchung an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Ungepaarter T-Test). PE=Phenylephrin

Wie aus Abb. 23 ersichtlich, übte eine Langzeit-Behandlung mit dem  $\alpha$ -adrenergen Stimulus PE *in vivo* einen regulatorischen Effekt auf die Transkription des A3-Rezeptor-Subtyps aus, wohingegen die übrigen Subtypen auf mRNA-Ebene weitgehend unbeeinflusst blieben. Auf Proteinebene hingegen konnte sowohl die bereits *in vitro* beobachtete PE-abhängige Heraufregulation des A1-Rezeptors, als auch eine Expressionszunahme der übrigen Rezeptor-Subtypen detektiert werden. Hierbei lag etwa eine um 50% gesteigerte Expression aller Rezeptoren vor.

## 4.2.2 Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Induktion hypertropher Antworten im Mausmodell

Ziel der Analyse war, den Einfluss einer permanenten A1-Rezeptor-Aktivierung auf die Ausprägung PE-induzierter Hypertrophie im Mausmodell zu untersuchen. Nach 3-wöchiger Behandlung der Versuchstiere mit NaCl (Kontrolle), PE, CPA bzw. einer Kombination dieser beiden Substanzen und Explantation der osmotischen Pumpen wurde der aus den Behandlungen resultierende kardiale Phänotyp anhand morphologischer Hypertrophie-Marker determiniert. Auf makroskopischer Ebene zählen hierzu die Zunahme des Herzgewichtes, des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses und der Herzgewicht/Tibialängen-Ratio.



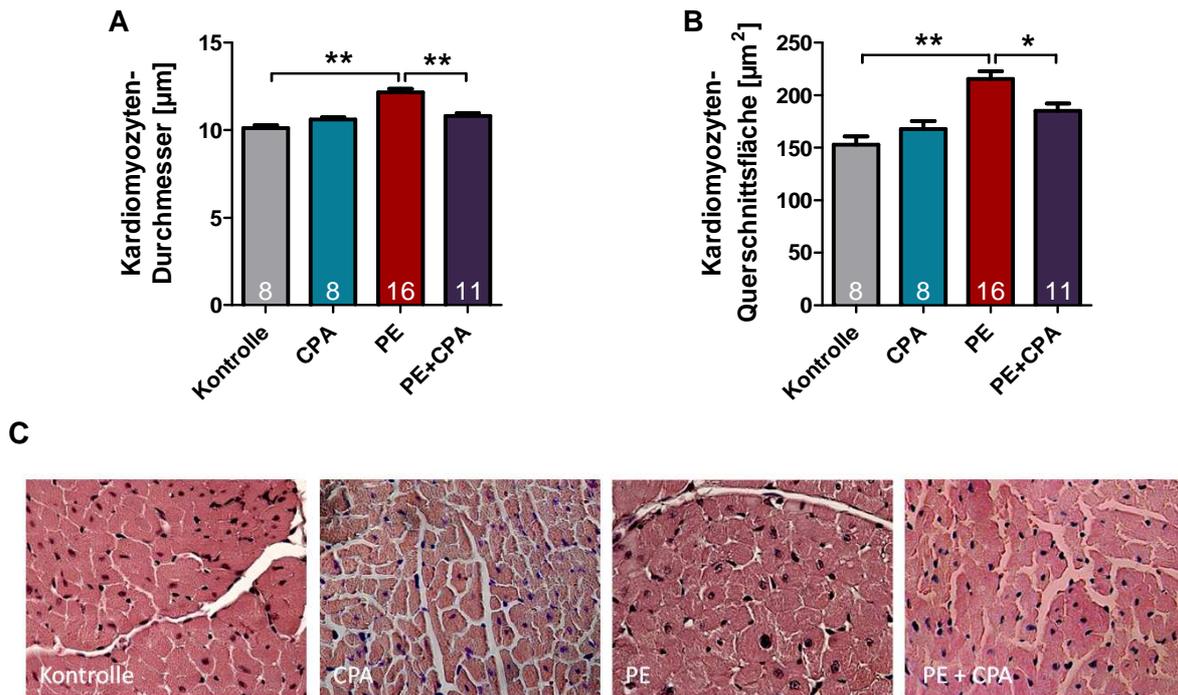
**Abb. 24: Kontinuierliche A1-Rezeptor-Aktivierung wirkt der PE-vermittelten Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses entgegen**

Männliche C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA, bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA (PE+CPA). Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurde (A) das Körpergewicht in g, (B) das Herzgewicht in mg und die Tibialänge in cm bestimmt, um nachfolgend (C) das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis, sowie (D) die Herzgewicht/Tibialänge-Ratio zu ermitteln (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin

---

Wie in Abb. 24 gezeigt, führte, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine kontinuierliche PE-Behandlung *in vivo* lediglich zu einer tendenziellen Zunahme des Herzgewichtes. Die gleichzeitige aus der Behandlung resultierende Abnahme des Körpergewichtes ergab eine für den hypertrophen Phänotyp charakteristische Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses. Eine simultane Aktivierung des A1-Rezeptors bewirkte die Inhibition dieses PE-vermittelten Effekts. Das Herzgewicht/Tibiallänge-Verhältnis blieb unbeeinflusst von den unterschiedlichen Behandlungen. CPA-behandelte Tiere wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Bestimmung der Feucht- und Trockengewichte von Lunge, Leber, Milz und Niere lieferten keine Hinweise auf eine Ödembildung, resultierend aus den verschiedenen Langzeitbehandlungen.

Ein erhöhtes Herzgewicht im hypertrophen Phänotyp ist vorrangig darauf zurück zu führen, dass im Zuge der Ausprägung (mal)adaptiver Antworten eine Kardiomyozyten-Hypertrophie, d. h. eine Ausdehnung der Herzmuskelzellen von statten geht. Demzufolge zählt, wie bereits erwähnt, die Vergrößerung der Kardiomyozyten zu den Hypertrophie-Markern auf zellulärer Ebene. Ein Ausbleiben der Herzgewichtszunahme schließt eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen nicht aus, da Faktoren wie die Induktion der Apoptose und/oder der kardialen Fibrose, sowie kompensatorische Umbauprozesse der Herzwände wiederum trotz Größenzunahme der Myozyten, der Massenzunahme entgegen wirken können. In der Folge sollte also eine mögliche Größenzunahme der Kardiomyozyten histologisch untersucht werden.

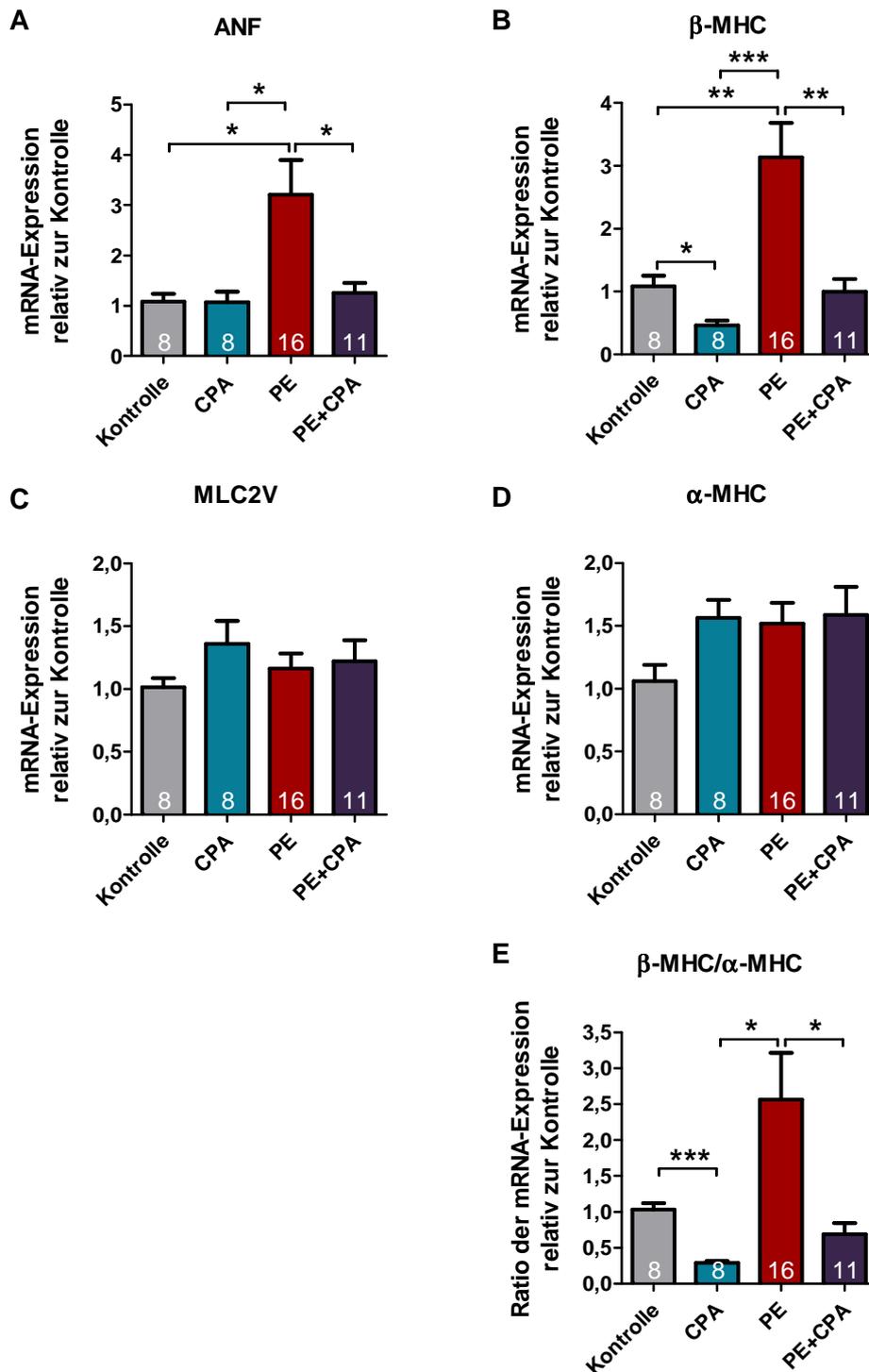


**Abb. 25: Kontinuierliche A1-Aktivierung inhibiert die PE-induzierte Größenzunahme der Kardiomyozyten**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion von NaCl (Kontrolle), CPA bzw. von PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurden (A) Durchmesser in µm und (B) Querschnittsfläche in µm<sup>2</sup> HE-gefärbter Kardiomyozyten in 40-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgemessen (Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \*p<0,05; \*\*p<0,01; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). (C) Exemplarische Bilder HE-gefärbter Kardiomyozyten der 4 Behandlungsgruppen. CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin

Auf mikroskopischer Ebene konnte, wie aus Abb. 25 ersichtlich, der PE-induzierte hypertrophe Phänotyp durch Zunahme des Kardiomyozyten-Durchmessers und der -Querschnittsfläche verifiziert werden. Ein simultaner Agonismus des A1-Rezeptors durch CPA führte zur Abschwächung der PE-induzierten Kardiomyozyten-Vergrößerung. Eine CPA-Behandlung per se lieferte keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der untersuchten Hypertrophie-Marker.

Ein molekulares Merkmal der pathologischen Hypertrophie ist, wie bereits unter 4.1.2 beschrieben, die anormale Modulation im Gehalt kontraktile Proteine und der Myofilament-Organisation als Konsequenz der Reaktivierung fetaler Gene, deren Produkte die kardiale Kontraktilität und das Calcium-Handling regulieren. Die Analyse der mRNA-Expression der fetalen Gene ANF (Atrialer Natriuretischer Faktor), β-MHC (Myosin Heavy Chain Isoform β) und MLC2V (Ventricular Myosin Light Chain Isoform 2), sowie des adulten kontraktile Gens α-MHC (Myosin Heavy Chain Isoform α) erfolgte nach Ablauf der Behandlungsdauer mittels quantitativer RT-PCR-Analysen.



**Abb. 26: Kontinuierliche A1-Aktivierung antagonisiert die  $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Re-Expression der fetalen Gene ANF und  $\beta$ -MHC und den  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten MHC-Expressions-Shift**

Nach 3-wöchiger Infusion von NaCl (Kontrolle), CPA bzw. von PE in Ab- und Anwesenheit von CPA, wurden die Gene (A) ANF, (B)  $\beta$ -MHC, (C) MLC2V und (D)  $\alpha$ -MHC mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert und (E) das  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC-Expressionsverhältnis kalkuliert. Die Expression der einzelnen Gene wurde pro Behandlungsgruppe gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Kontrollgruppe gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; ANF=Atrialer Natriuretischer Faktor;  $\beta$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\beta$ ;  $\alpha$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\alpha$ ; MLC2V=Ventricular Myosin Light Chain Isoform 2

Abb. 26 zeigt, dass eine selektive A1-Aktivierung die PE-vermittelte dreifach erhöhte Expression der fetalen Gene ANF und  $\beta$ -MHC vollständig unterbinden konnte und weiterhin die PE-induzierte MHC-Expressionsverschiebung zu Gunsten der adulten Isoform  $\alpha$ -MHC umkehrte. Darüberhinaus resultierte eine CPA-Behandlung per se sogar in der transkriptionellen Herabregulation des fetalen Gens  $\beta$ -MHC und folglich in der Verschiebung des MHC-Expressions-Shifts unter Kontrollniveau. MLC2V und die adulte MHC-Isoform  $\alpha$ -MHC unterlagen keiner Expressionsmodulation durch die verschiedenen Behandlungen.

Der aus den Behandlungen resultierende kardiale Phänotyp wurde nicht nur durch die beschriebenen Charakteristika hypertropher Myozyten, sondern weiterhin morphologisch und funktionell mittels Echokardiographie und kardialem MRT untersucht.

**Tabelle 29: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und/oder des  $\alpha$ -Adrenorezeptors bewirkt keine Modulation funktioneller und morphologischer, echokardiographisch determinierter Parameter**

	<u>Kontrolle (n=7)</u>	<u>CPA (n=5)</u>	<u>PE (n=13)</u>	<u>PE+CPA (n=11)</u>
<b>LVPW; d [<math>\mu</math>m] <math>\pm</math> SEM</b>	0,63 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,02
<b>IVS; d [<math>\mu</math>m] <math>\pm</math> SEM</b>	0,55 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,21
<b>LVEDD [<math>\mu</math>m] <math>\pm</math> SEM</b>	4,52 $\pm$ 0,06	4,95 $\pm$ 0,16	4,60 $\pm$ 0,06	4,68 $\pm$ 0,08
<b>LVESD [<math>\mu</math>m] <math>\pm</math> SEM</b>	3,61 $\pm$ 0,09	4,14 $\pm$ 0,66 +	3,54 $\pm$ 0,07	3,80 $\pm$ 0,13
<b>FS [%] <math>\pm</math> SEM</b>	20,12 $\pm$ 1,56	16,48 $\pm$ 1,14	22,98 $\pm$ 1,32	18,96 $\pm$ 1,89

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt; +p<0,05 CPA vs. PE; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test; LV=Linksventrikulär; PW=Hinterwand; IVS=Interventrikuläres Septum; EDD/ESD=Enddiastolischer/Endsystolischer Durchmesser; FS=Verkürzungsfraction; d=enddiastolisch

Die in Tabelle 29 dargestellten Ergebnisse echokardiographischer Untersuchungen zeigen, dass weder eine A1-Rezeptor-, noch eine  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Aktivierung eine evidente Modulation der ventrikulären Dilatation oder Funktion bewirkte. Bezüglich der ermittelten Kavitätsgrößen resultierte die CPA-Behandlung in einer Zunahme des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers gegenüber einer kontinuierlichen PE-Stimulation. Das Ausbleiben einer signifikanten systolischen Durchmesser-Zunahme gegenüber den Kontrolltieren und die große Streuung der Einzelwerte des betrachteten Parameters in der CPA-Gruppe lassen jedoch keinen Rückschluss auf einen eindeutigen Effekt zu.

Neben der Echokardiographie, wurde ebenfalls das kardiale MRT zur funktionellen und morphologischen Beurteilung der Versuchstiere herangezogen. Dieses Bildge-

bungsverfahren ermöglicht neben der Determinierung der linksventrikulären Kavitätsgrößen (LVED/ES vol, Linksventrikuläres enddiastolisches/endsystolisches Volumen [ $\mu\text{l}$ ]) und der Masse (LV-Masse [mg]) die Beurteilung der systolischen Funktion durch Kalkulation des Schlagvolumens (SV [ $\mu\text{l}$ ]), des Herzzeitvolumens (HZV [ml/min]) und der prozentualen Auswurffraktion („Ejection Fraction“, EF [%]).

**Tabelle 30: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und/oder des  $\alpha$ -Adrenorezeptors bewirkt keine Modulation funktioneller und morphologischer, im MRT determinierbarer Parameter**

	<b>Kontrolle (n=5)</b>	<b>CPA (n=5)</b>	<b>PE (n=9)</b>	<b>PE+CPA (n=7)</b>
<b>LV-Masse [mg] <math>\pm</math> SEM</b>	79,59 $\pm$ 3,46	84,25 $\pm$ 3,15	87,69 $\pm$ 4,90	81,38 $\pm$ 3,09
<b>LV-Masse [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	74,60 $\pm$ 4,31	80,26 $\pm$ 3,00	83,52 $\pm$ 4,67	77,51 $\pm$ 2,95
<b>LVED vol [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	53,60 $\pm$ 3,47	59,07 $\pm$ 5,20	62,97 $\pm$ 3,83	50,28 $\pm$ 5,67
<b>LVES vol [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	18,56 $\pm$ 1,80	23,04 $\pm$ 3,04	25,22 $\pm$ 2,44	17,00 $\pm$ 2,11
<b>SV [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	35,06 $\pm$ 2,88	35,25 $\pm$ 2,52	37,62 $\pm$ 2,35	33,29 $\pm$ 4,19
<b>HZV [ml/min] <math>\pm</math> SEM</b>	18,50 $\pm$ 1,93	16,93 $\pm$ 1,60	17,71 $\pm$ 2,12	14,87 $\pm$ 2,46
<b>EF [%] <math>\pm</math> SEM</b>	65,00 $\pm$ 3,17	60,32 $\pm$ 2,19	60,38 $\pm$ 2,12	66,56 $\pm$ 2,91
<b>Frequenz <math>\pm</math> SEM</b>	539 $\pm$ 45	450 $\pm$ 47	434 $\pm$ 37	441 $\pm$ 26

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test  
 LV=Linksventrikulär; ED/ES vol=Enddiastolisches/Endsystolisches Volumen; SV=Schlagvolumen;  
 HZV=Herzzeitvolumen; EF=Ejektionsfraktion

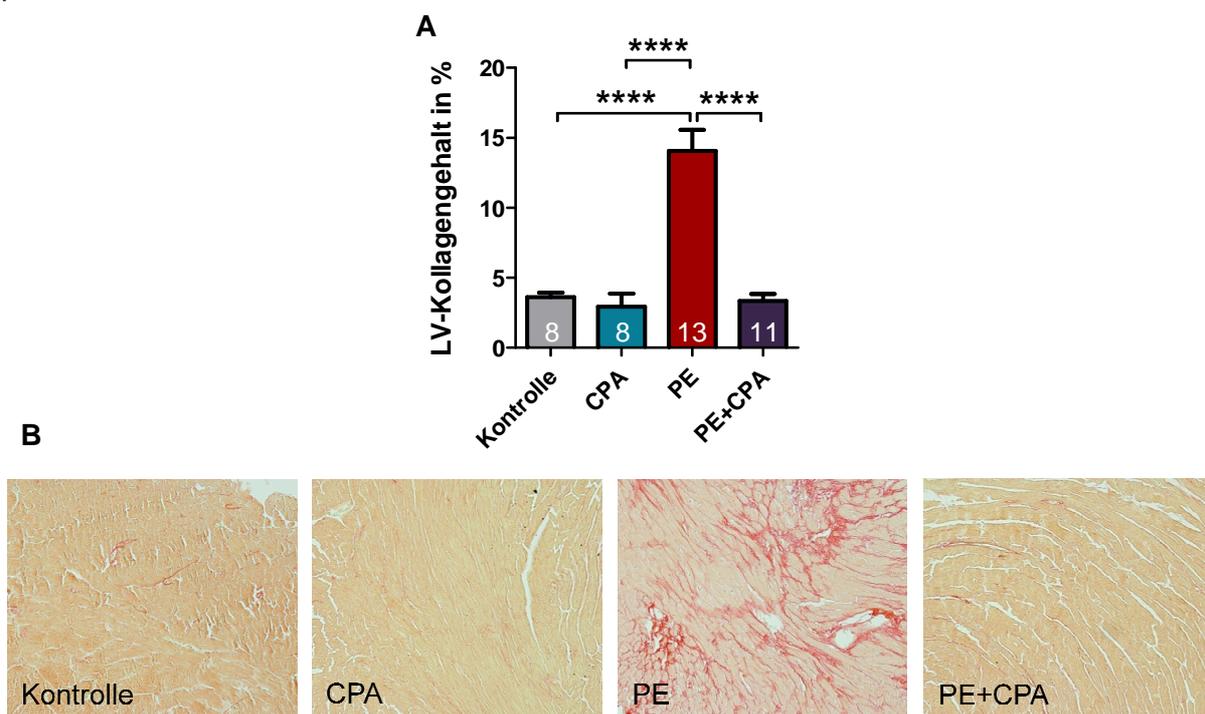
Die kardialen MRT-Analysen zeigen, dass gegenüber der Kontrollgruppe weder der A1-Agonist, noch der maladaptive Stimulus PE einen Einfluss auf die analysierten Kavitätsgrößen ausübte, der durch das jeweils andere Agens hätte modifiziert werden können. PE-behandelte Tiere wiesen lediglich tendenziell die größten Volumina und Massen auf. Des Weiteren wurde, unabhängig vom verwendeten Stimulus, die systolische Funktion der untersuchten Herzen aufrecht erhalten. Somit lieferten die beiden angewandten Bildgebungsverfahren keinen Hinweis auf PE-induzierte ventrikuläre Umbauprozesse oder kardiale Funktionsstörungen. Die in der Tabelle aufgeführten Herzfrequenzen liefern keinen Hinweis auf hämodynamische Effekte der pharmakologischen Behandlungen.

Zusammenfassend zeigen die unter 4.2.2 dargestellten Ergebnisse, dass ein kontinuierlicher A1-Agonismus die PE-induzierte Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses inhibierte und auf zellulärer Ebene der hypertrophen Antwort durch Inhibition der PE-vermittelten Vergrößerung des Kardiomyozyten-Durchmessers und der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche, sowie durch Hem-

mung der Re-Expression fetaler Gene entgegen wirkte. Die A1-Aktivierung per se resultierte darüber hinaus in einer transkriptionellen Reduktion von  $\beta$ -MHC und in einer Verschiebung des  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC-Shifts zu Gunsten der adulten Isoform, was auf eine A1-Rezeptor-bedingte Konditionierung der Kardiomyozyten zur Prävention maladaptiver Antworten hinweisen könnte. Die kardiale Architektur und Funktion blieb unbeeinflusst von der Stimulation des A1- oder des  $\alpha$ -Adrenorezeptors.

### 4.2.3 Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Induktion fibrotischer Antworten im Mausmodell

Maladaptive Antworten schließen neben der Induktion der zellulären Hypertrophie auch fibrotische Prozesse ein. Um den Einfluss der verschiedenen Behandlungen im untersuchten Mausmodell auf die Auslösung pro-fibrotischer Antworten zu untersuchen, wurde zunächst der linksventrikuläre Kollagengehalt in den Behandlungsgruppen determiniert.



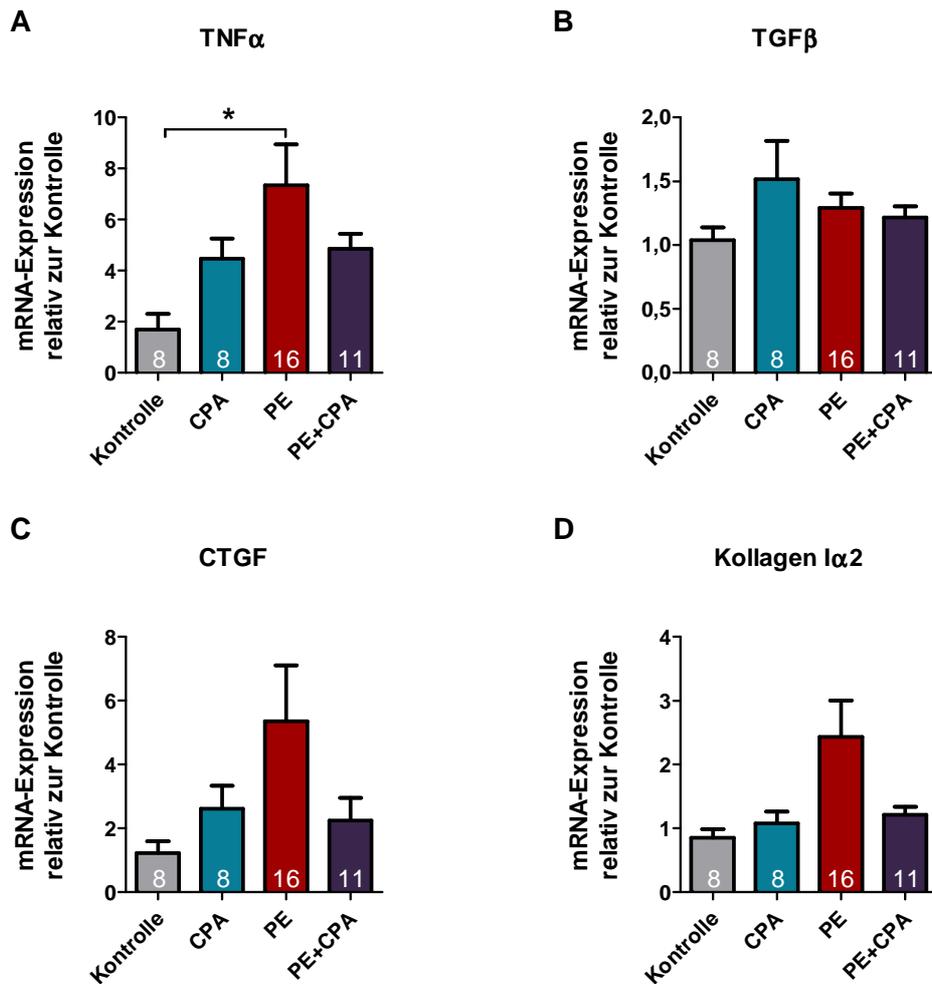
**Abb. 27: Aktivierung des A1-Rezeptors inhibiert die  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-induzierte interstitielle Fibrose**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion von NaCl (Kontrolle), CPA bzw. von PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. (A) Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurde der prozentuale linksventrikuläre Kollagengehalt in Sirius Red gefärbten mittventrikulären Gewebeschnitten in 10-facher Vergrößerung bestimmt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). (B) Exemplarische Bilder Sirius Red gefärbter Kardiomyozyten der 4 Behandlungsgruppen, aufgenommen in 10-facher Vergrößerung. CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; LV=linksventrikulär

---

Die in Abb. 27 gezeigte Auswertung des linksventrikulären Kollagengehaltes ergab, dass die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation mit PE zur Induktion eines ausgeprägten fibrotischen Phänotyps führte. So besaßen die Kontrolltiere einen linksventrikulären Kollagengehalt von  $3,6 \pm 0,3\%$ , die PE-behandelten Tiere hingegen einen prozentualen Anteil fibrotischen Gewebes von  $14 \pm 1,4\%$ . Eine selektive A1-Aktivierung hob den PE-induzierten maladaptiven Effekt vollständig auf.

Auf molekularer Ebene gelten die Expressionszunahmen der CTGF (Connective Tissue Growth Factor)-, TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ )- und TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )-codierenden Gene zu typischen Merkmalen des maladaptiven Phänotyps, da diese proliferativ wirken und die Synthese der extrazellulären Matrix aus Fibroblasten stimulieren und somit regulatorische Rollen bei der Kollagensynthese und den linksventrikulären Umbauprozessen spielen. Deshalb wurden die Transkriptionsmuster dieser Faktoren, sowie die mRNA-Expression von Kollagen I $\alpha$ 2 in den verschiedenen Behandlungsgruppen untersucht.

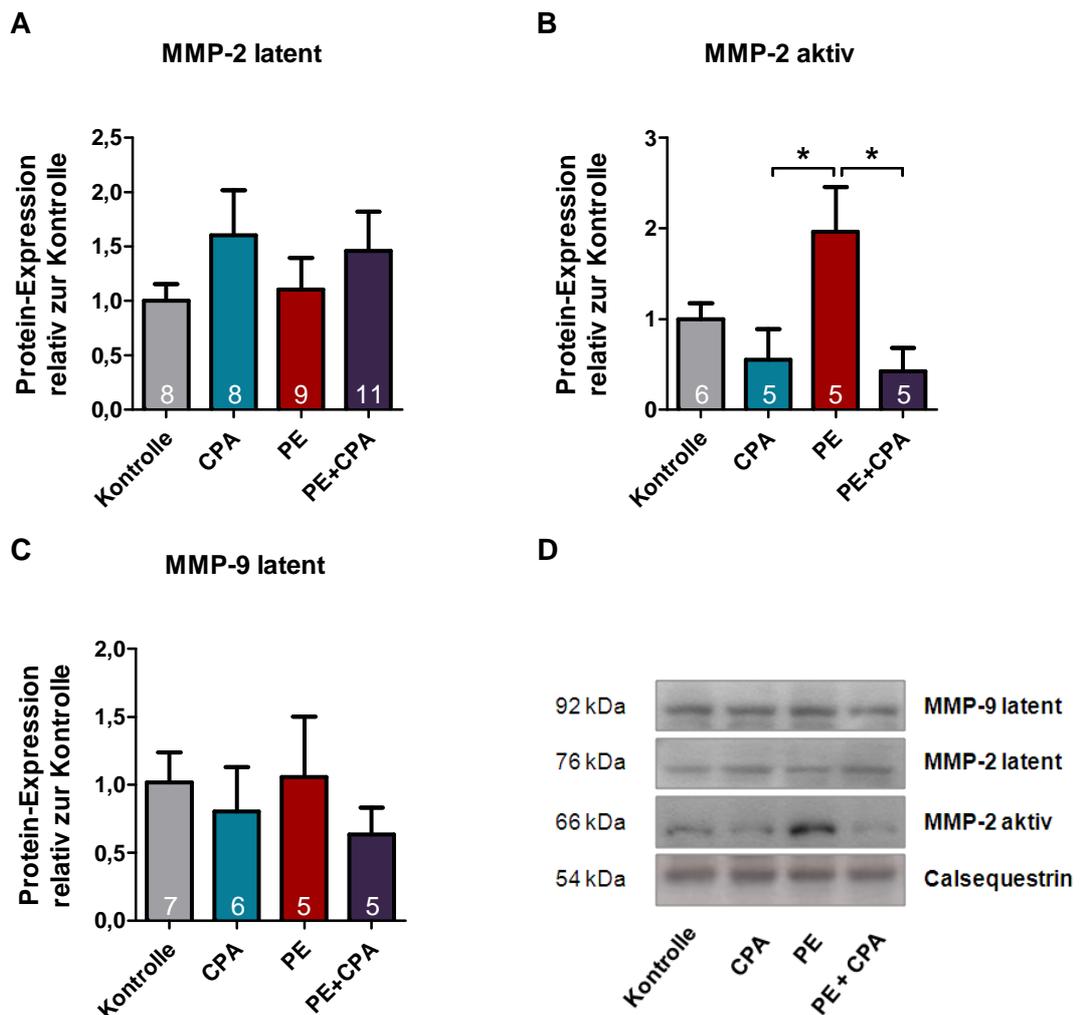


**Abb. 28: Kontinuierliche Aktivierung des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors führt tendenziell zur transkriptionellen Heraufregulation pro-fibrotischer Faktoren**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurden die Gene (A) TNF $\alpha$ , (B) TGF $\beta$ , (C) CTGF und (D) Kollagen I $\alpha$ 2 mittels TaqMan<sup>®</sup>-PCR amplifiziert. Die Expression der einzelnen Gene wurde pro Behandlungsgruppe gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Kontrollgruppe gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; TNF $\alpha$ =Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ; TGF $\beta$ =Transforming Growth Factor  $\beta$ ; CTGF= Connective Tissue Growth Factor

Abb. 28 zeigt, dass eine 3-wöchige PE-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe zur Expressionszunahme der TNF $\alpha$ -mRNA führte, was einer tendenziellen Abschwächung durch den simultanen A1-Agonismus unterlag. CTGF und Kollagen I $\alpha$ 2 erfuhren eine tendenzielle Transkriptionssteigerung unter PE-Behandlung, welche unter Co-Stimulation mit CPA wiederum eher reduziert wurde. Bezüglich TGF $\beta$  lagen, unabhängig vom Stimulus, keine evidenten transkriptionellen Modulationen vor.

Die zuvor untersuchten pro-fibrotischen Faktoren stimulieren die Synthese der extrazellulären Matrix. So vermögen CTGF und TNF $\alpha$  in ihrer Funktion unter Anderem die Expression der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) 2 und 9 zu regulieren. Um nun den Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf die Ausprägung des maladaptiven Phänotyps eingehender zu analysieren, wurde die Expression der genannten MMPs, als Effektoren des linksventrikulären Remodelings, auf Proteinebene untersucht.



**Abb. 29: Aktivierung des A1-Rezeptors wirkt der PE-vermittelten Expressionszunahme der aktiven MMP-2 entgegen**

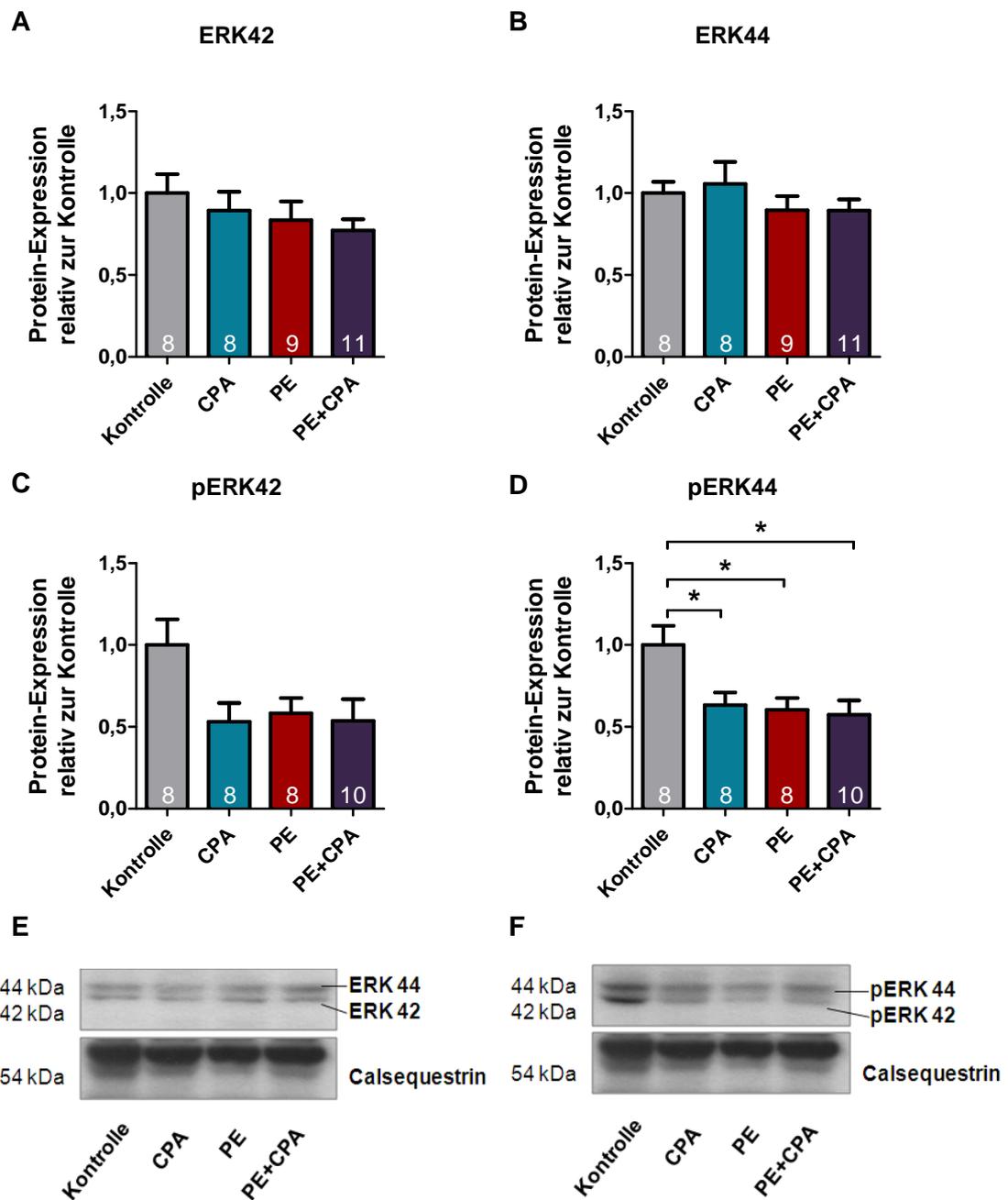
C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurden (A) die latente und (B) die aktive Form der MMP-2, sowie (C) die latente MMP-9 im Western-Blot detektiert. Als Expressionskontrolle diente Calsequestrin. Die Proteinbanden wurden densitometriert, die jeweilige MMP-Expression gegen die Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitometriert. \* $p < 0,05$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; MMP=Matrixmetalloproteinase

Konsistent mit der zuvor gezeigten Heraufregulation pro-fibrotischer Faktoren konnte, wie in Abb. 29 dargestellt, eine aus der Langzeit-PE-Behandlung resultierende ausgeprägte Expression der aktiven MMP-2 detektiert werden. Die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation führte hierbei zur Expressionssteigerung um mehr als das zweifache gegenüber der CPA-Behandlung, was durch simultane A1-Aktivierung vollständig inhibiert wurde. Das Expressionsmuster der latenten Form der MMP-2 korrelierte umgekehrt zum Expressionsstatus der aktiven Form in den 4 Mausgruppen, vermutlich durch anteilige Aktivierung der Proteine aus dem extrazellulären Pool inaktiver Zymogene. Die Expression der latenten MMP-9 unterlag keiner evidenten Modulation durch die verschiedenen Behandlungen, schien jedoch unter A1-Aktivierung tendenziell schwächer exprimiert zu werden. Eine aktive Form dieser MMP konnte in keiner der Mausgruppen detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die unter 4.2.3 dargestellten Ergebnisse, dass eine A1-Aktivierung nicht nur die pro-hypertrophen, sondern auch die pro-fibrotischen Antworten in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation inhibiert, vermutlich durch Modulation der TNF $\alpha$ -, CTGF- und Kollagen I $\alpha$ 2-mRNA-Expression. Weiterhin weist die CPA-vermittelte Hemmung der PE-induzierten MMP-2-Aktivierung auf eine protektive Rolle des A1-Rezeptors beim ventrikulären Remodeling-Prozess hin.

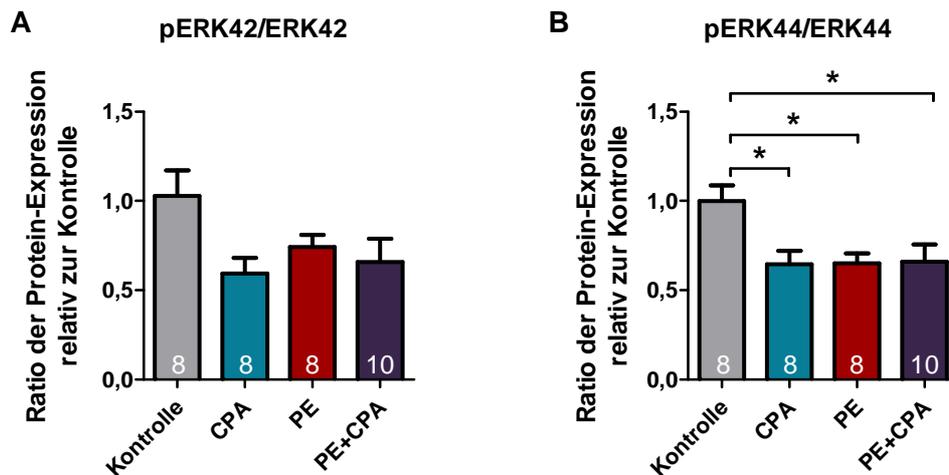
#### **4.2.4 Untersuchungen zur Identifizierung des Effektors der A1-Rezeptor-vermittelten Antagonisierung PE-induzierter maladaptiver Antworten**

Um die Frage zu klären, in welcher Weise Adenosin, agierend über seinen A1-Rezeptor, die PE-vermittelte maladaptive Signaltransduktion im Mausmodell antagonisiert, wurde zunächst der Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf Expressionsmuster und Aktivitätszustand der extrazellulär regulierten Kinase ERK42/44 im Western-Blot untersucht. ERK42/44, eine Komponente der MAPK-Kaskade, gilt als down-stream Mediator Gq-induzierter Signalwege zur Vermittlung hypertropher Antworten.



**Abb. 30: Aktivierung von ERK44 unterliegt einer negativen Regulation durch kontinuierliche Aktivierung des A1- und des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors**

C57/Bl6N Mäuse erhielten eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach 3 Wochen wurde die Gesamtexpression der beiden ERK-Isoformen (A) ERK42 und (B) ERK44, sowie deren Aktivitätsstatus (C, D) im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. (E, F) Exemplarische Western-Blots. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; ERK= Extrazellulär regulierte Kinase; p=phospho-



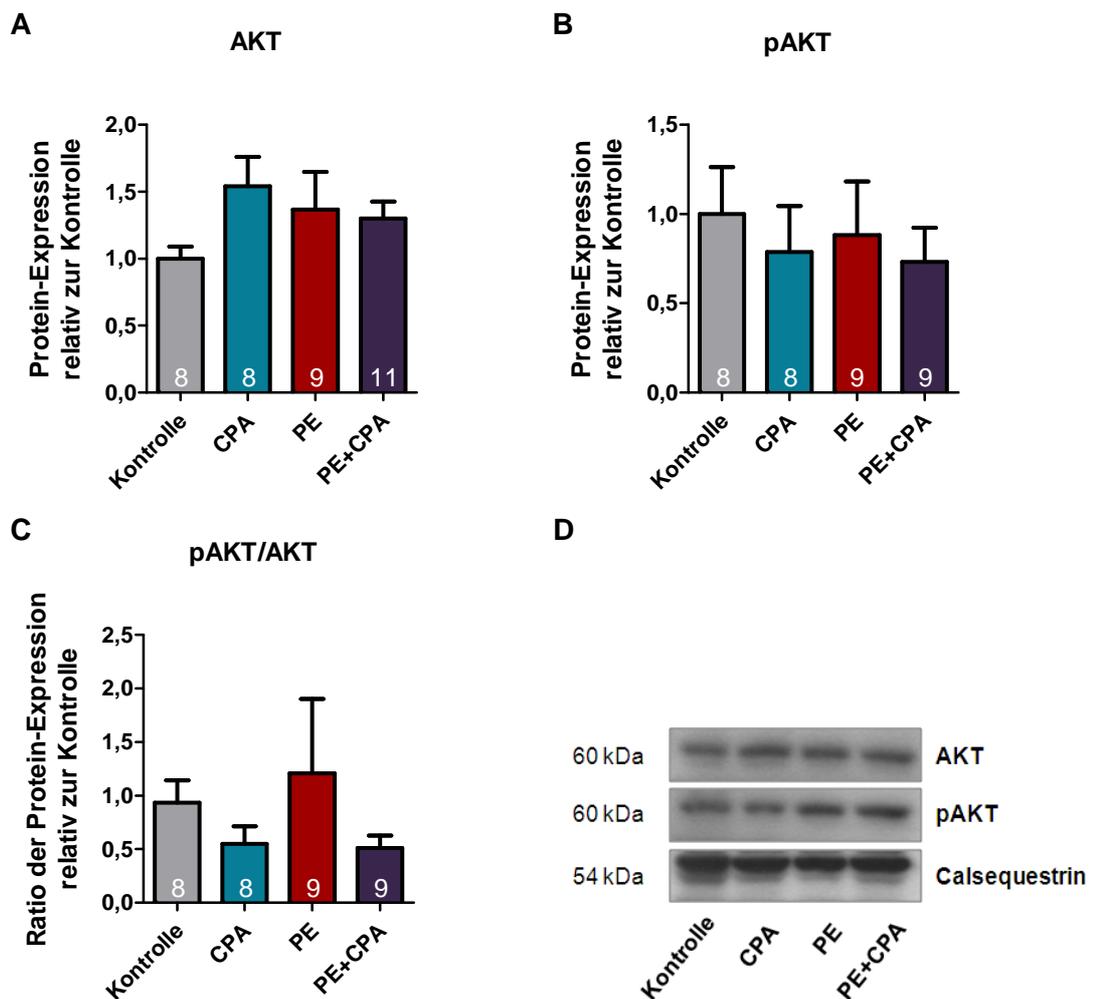
**Abb. 31: Kontinuierliche Aktivierung des A1- und des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors verschiebt das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver ERK44 in Richtung der inaktiven Isoform**

C57/Bl6N Mäuse erhielten eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach 3 Wochen wurden Gesamtexpression und Aktivierungsstatus von (A) ERK42 und (B) ERK44 im Western-Blot detektiert, gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. Der Anteil aktivierter/phosphorylierter Isoformen der Kinasen wurde in Relation zur jeweiligen Gesamtexpression ermittelt (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere; \* $p < 0,05$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; ERK= Extrazellulär regulierte Kinase; p=phospho-

Die in Abb. 30 dargestellten Expressionsanalysen der MAP-Kinase ERK zeigen, dass die Gesamtexpression ihrer beiden Isoformen ERK42 und ERK44 unbeeinflusst von einer A1-Aktivierung und dem maladaptiven Stimulus PE blieb. Verglichen mit der Kontrollgruppe war unter Behandlung mit CPA, PE bzw. einer Kombination der beiden Substanzen jedoch eine deutlich geringere Aktivierung (im Sinne einer Phosphorylierung) der ERK44 zu verzeichnen. Dieser Trend zeigte sich auch bezüglich der phosphorylierten Isoform ERK42. Eine Betrachtung des Verhältnisses zwischen aktivem Protein und Gesamtexpression in Abb. 31 spiegelte jeweils die Beobachtung wider, dass sowohl Stimulation des A1-, als auch des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors eine verringerte Aktivität der betrachteten Kinase gegenüber dem Kontrollniveau nach sich zog. Demzufolge konnte ERK42/44 keine Schlüsselrolle bei der A1-vermittelten Hemmung  $\alpha$ -adrenerg induzierter, pro-hypertropher Signaltransduktion zugewiesen werden, da sie von den verwendeten Stimuli in gleicher Weise reguliert wurde.

Neben der MAP-Kinase ERK wurde weiterhin die Induktion der adaptiven PI3-Kinase Kaskade in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Behandlungen untersucht. Hierfür wurden Expressions- und Aktivitätsstatus der Kinase AKT und deren down-

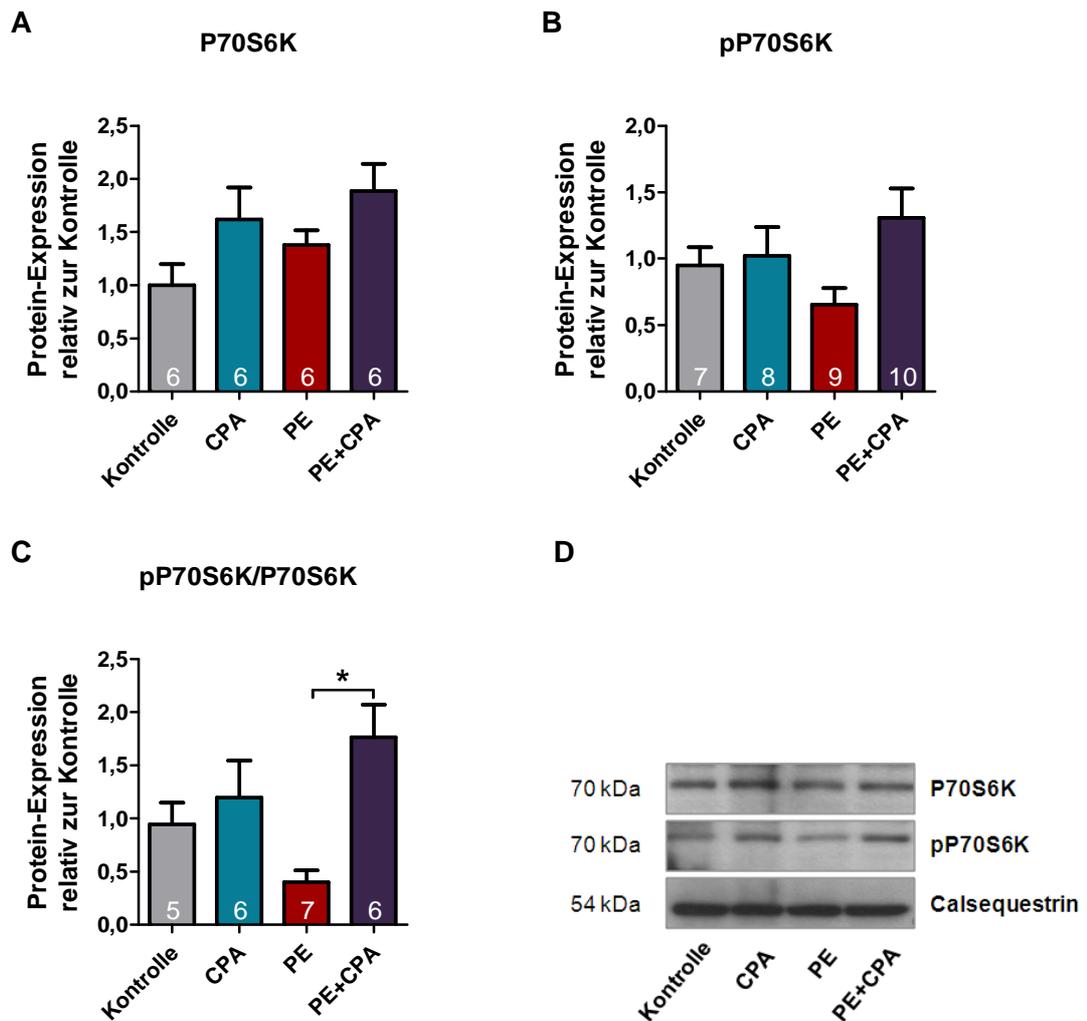
stream target, der P70S6K (Ribosomale Proteinkinase S6K), im Western-Blot analysiert. Die P70S6K wird als Endeffektor des adaptiven Signalwegs wirksam und induziert die charakteristische Zunahme der Proteinsynthese hypertropher Myozyten. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Stimulation des A1- und des  $\alpha$ -Adrenorezeptors auf Expression und Aktivität der Kinase GSK3 $\beta$  (Glycogensynthasekinase) untersucht. Deren Inaktivierung, vermittelt über die beiden zuvor genannten Kinasen, stellt die Voraussetzung für die Induktion einer hypertrophen Antwort dar.



**Abb. 32: Expression und Aktivierung der Proteinkinase AKT unterliegt keinem Einfluss durch Aktivierung des A1- und des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf des Behandlungszeitraumes wurde (A) Gesamtexpression und (B) Aktivitätsstatus der Proteinkinase AKT im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. (C) Der Anteil aktivierter/phosphorylierter Kinase wurde in Relation zur Gesamtexpression ermittelt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometrisch vermessen) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; AKT=Proteinkinase B; p=phospho-

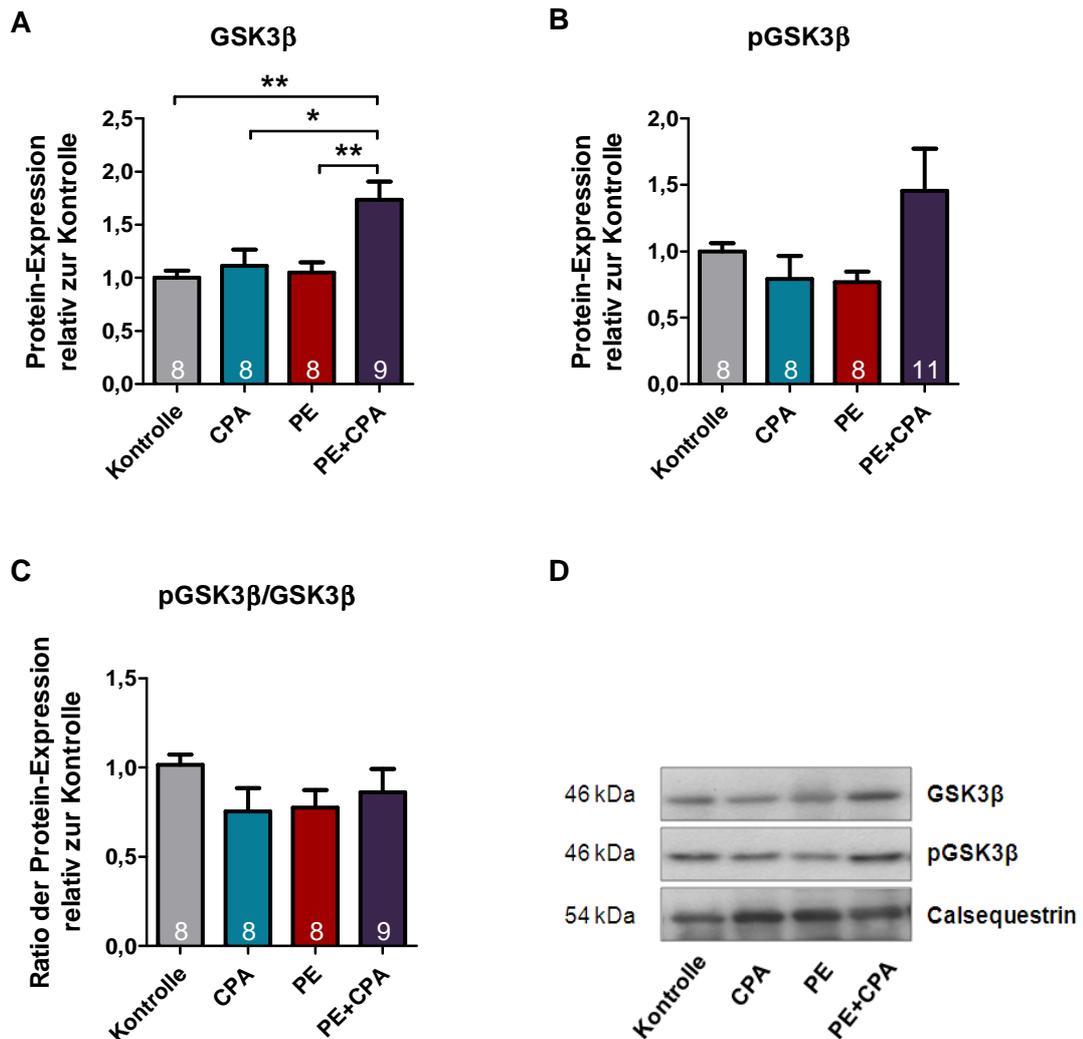
Die in Abb. 32 dargestellten Expressionsanalysen liefern keinen Hinweis auf eine translationale Regulation der Proteinkinase AKT, hervorgerufen durch einen A1-Agonismus oder den maladaptiven Stimulus PE. Auch die Phosphorylierung (und somit Aktivierung) des Proteins blieb unbeeinflusst von der Stimulation des A1- bzw. des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors.



**Abb. 33: Co-Stimulation des A1- und des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors führt zur Verschiebung des pP70S6K/P70S6K-Expressionsverhältnisses zu Gunsten der aktiven Isoform**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf des Behandlungsdauer wurde (A) Gesamtexpression und (B) Aktivitätsstatus der ribosomalen Proteinkinase P70S6 im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. (C) Der Anteil inaktiver/phosphorylierter Kinase wurde in Relation zur Gesamtexpression ermittelt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; P70S6K=Ribosomale Proteinkinase P70S6; p=phospho-

Wie in Abb. 33 gezeigt, unterlagen Gesamtexpression und Aktivierung der P70S6K tendenziell einer Heraufregulation durch die A1-Aktivierung per se bzw. durch den A1-Agonisten in Gegenwart des maladaptiven Stimulus. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass Adenosin adaptive Signalwege anschaltet oder unterstützt, um dem Übergang zum dekompensierten Zustand des Herzens bei chronischer maladaptiver Stimulation entgegenzuwirken.

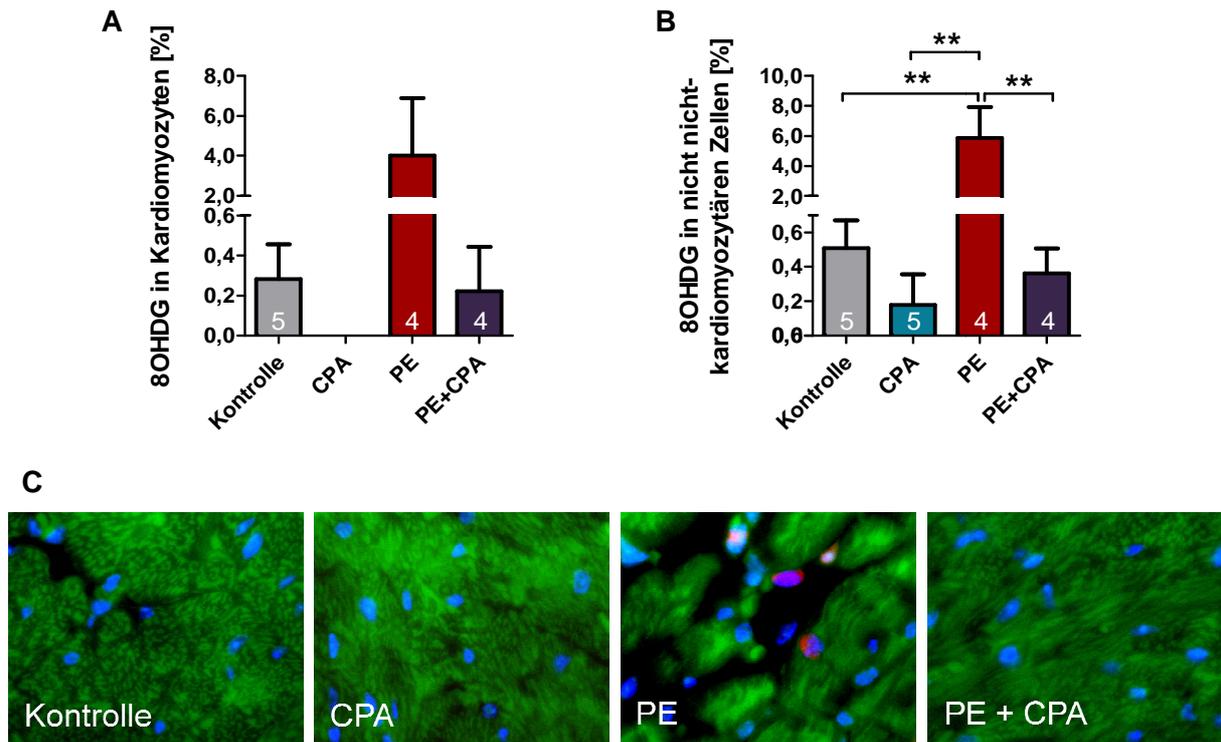


**Abb. 34: Gesamtexpression der aktiven GSK3 $\beta$  unterliegt einer Heraufregulation durch simultane Aktivierung des A1- und des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurde (A) Gesamtexpression und (B) Aktivitätsstatus der Glycogensynthasekinase GSK3 $\beta$  im Western-Blot detektiert, gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Kontrollgruppe gesetzt. (C) Der Anteil inaktivierter/phosphorylierter Kinase wurde in Relation zur Gesamtexpression ermittelt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometriert. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; GSK3 $\beta$ = Glycogensynthasekinase 3  $\beta$ ; p=phospho

Aus Abb. 34 geht hervor, dass eine Co-Stimulation mit CPA und PE *in vivo* zu einer Heraufregulation der GSK3 $\beta$ -Gesamtexpression führte und zwar verglichen mit un-behandelten, CPA- und PE-behandelten Mäusen. Die Expression des phosphorylier-ten, im Falle der Glycogensynthasekinase inaktiven Enzyms, spiegelte dieses Ex-pressionsmuster tendenziell wider. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass eine Co-Stimulation der Versuchstiere mit CPA und PE zur Expressionssteigerung und unmittelbar zur Phosphorylierung des vermehrt exprimierten Enzyms führte. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass die A1-Aktivierung erst in Gegenwart des maladaptiven Stimulus die Expression der anti-hypertroph wirkenden Kinase auslöst. Die vermehrte Expression der unmodifizierten Kinase wirkt sich negativ auf die In-duktion hypertropher Antworten aus, die Phosphorylierung und somit Inaktivierung der Kinase ist Voraussetzung für die Auslösung pro-hypertropher Effekte. Somit bleibt die gleichzeitige Expressionszunahme beider Isoformen vermutlich ohne Ef-fekt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass keiner der in diesem Versuch analysierten Kinasen eine Schlüsselrolle bei der Adenosin-vermittelten Hemmung PE-induzierter hypertropher Antworten zugeschrieben werden konnte. Lediglich die tendenzielle CPA-bedingte Steigerung der P70S6K-Expression/Aktivierung könnte einen Hinweis darauf liefern, dass Adenosin seine Hemmung maladaptiver Antworten über Indukti-on adaptiver Antworten auslöst. Zur Klärung der Frage nach dem „Schalter“, der durch CPA-Behandlung anti-hypertrophe, durch ungehemmte PE-Stimulation pro-hypertrophe kardiale Antworten auslöst, wurde nachfolgend der Einfluss der Sub-stanzen auf die Generierung von oxidativem Stress untersucht. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gilt als kritischer Faktor bei der Entwicklung pathologischer Hypertrophie, aber auch bei Fibrose. In Folge DNA-schädigender ROS-Produktion entsteht das oxidierte Guanosin-Derivat 8-Hydroxy-Diguanosin (8OHDG), dessen prozentualer zellulärer Gehalt den Stärkegrad oxidativer Schäden reflektiert.



**Abb. 35: A1-Rezeptor-Aktivierung inhibiert die PE-induzierte ROS-Produktion in Kardiomyozyten und nicht-myozytären Herzzellen**

C57/Bl6N Mäuse erhielten über 3 Wochen eine kontinuierliche Infusion mit NaCl (Kontrolle), CPA bzw. mit PE in Ab- und Anwesenheit von CPA. Nach Ablauf der Behandlungsdauer und Immunfärbung wurde der prozentuale 8OHdG-Gehalt in 100-facher Vergrößerung in (A) Kardiomyozyten und in (B) nicht-kardiomyozytären Herzzellen bestimmt. (C) Exemplarische Bilder der immungefärbten Zellen der 4 Behandlungsgruppen mit DAPI-gefärbten Nuklei und FRITC-markiertem 8OHdG, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung. (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test) CPA=N6-Cyclopentyladenosin; PE=Phenylephrin; 8OHdG=8-Hydroxy-Diguanosin

Aus der in Abb. 35 gezeigten prozentualen Bestimmung des 8OHdG-Gehalts, als Maß für oxidativen Stress, geht hervor, dass eine Phenylephrin-Behandlung über 3 Wochen gegenüber der Kontrolle zu einer deutlichen Zunahme der modifizierten Base in Kardiomyozyten und in nicht-kardiomyozytären Zellen im Herzen führte. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies konnte in den separat untersuchten Zelltypen durch simultane A1-Rezeptor-Aktivierung vollständig gehemmt werden. Darüber hinaus waren in Kardiomyozyten CPA-behandelter Tiere keinerlei 8OHdG-positive Nuklei detektierbar.

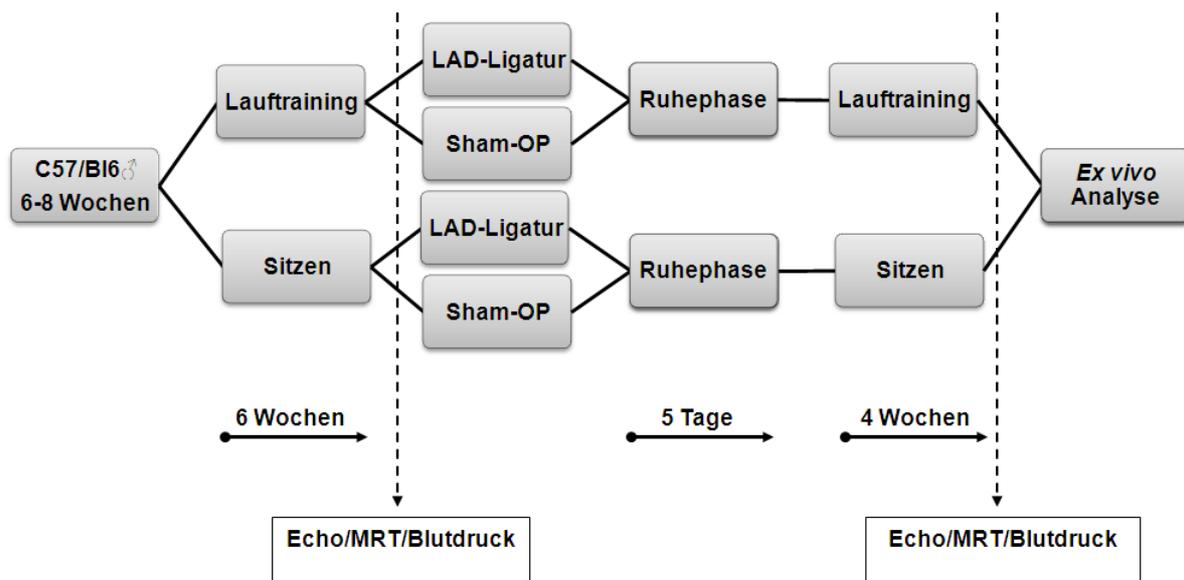
Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Teilprojekts, dass  $\alpha$ -adrenerge Rezeptor-Stimulation mit Phenylephrin *in vitro* und *in vivo* zur Heraufregulation des Adenosin-A1-Rezeptors führte, wohingegen Stimulation der Angiotensin II- und Igf-I-

Rezeptoren *in vitro* keinen vergleichbaren Effekt bewirkte. Da eine A1-Rezeptor-Aktivierung die PE-vermittelte Induktion pro-hypertropher und pro-fibrotischer Antworten inhibierte, könnte dies einen Rückkopplungsmechanismus reflektieren, über den Adenosin das hypertrophe Wachstum und die Fibrose in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation kontrolliert und dem maladaptiven Remodeling entgegen wirkt. Dies könnte zumindest teilweise über die Hemmung fetaler Genexpression, Prävention der MMP-2-Aktivierung und Inhibition von oxidativen Stress geschehen.

### **4.3 Untersuchungen zum Einfluss von Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt auf das linksventrikuläre Remodeling im Mausmodell mit besonderer Betrachtung der Rolle des Adenosinrezeptor-Systems und der extrazellulären Matrix**

Im Gegensatz dazu, dass körperliche Aktivität lange Zeit bei Patienten mit Herzinsuffizienz prinzipiell als kontraindiziert galt, wird dieses mittlerweile bei Patienten mit kompensierter Herzinsuffizienz empfohlen. So demonstrierte die „Exercise in left ventricular dysfunction“ (ELVD) Studie eine Verbesserung der kardialen Funktion durch Sport (Giannuzzi et al., 1997). *In vivo* Studien im Ratten-Modell legten zudem nahe, dass Ausdauertraining nach abgelaufenem Myokardinfarkt dem maladaptiven Remodeling-Prozess durch Abschwächung der ventrikulären Dilatation und Reduktion der Wandspannung entgegen wirkt (Orenstein et al., 1995). Der exakte Mechanismus, der den kardioprotektiven Wirkungen physischer Aktivität zu Grunde liegt, ist jedoch bisher nicht bekannt. Die zentrale Hypothese dieses Teilprojekts lautete, dass körperliche Aktivität durch Aktivierung des Igf-I-induzierten PI3K/AKT-Signalwegs und Adenosin-abhängige Mechanismen bzw. eventuell durch ein Zusammenspiel der Igf-I- und der Adenosin-vermittelten Signaltransduktion den ventrikulären Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt inhibiert und somit der Entwicklung der Herzinsuffizienz entgegen wirkt. Um diese Hypothese zu testen, wurden männliche C57/Bl6N Mäuse im Alter von 6-8 Wochen für 6 Wochen unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Laufradtraining gehalten. Die tägliche Kontrolle der zurückgelegten Distanz ergab eine durchschnittliche Laufstrecke von  $4,8 \pm 0,3$  km pro Tag. Eigene Vorstudien bestätigten, dass diese Laufleistung die Induktion einer physiologischen Hypertrophie gewährleistet. Nach 6 Wochen Ausdauertraining bzw. körperlicher Inaktivität wurden die Mäuse funktionell und morphologisch mittels Echo-

kardiographie, MRT und nicht-invasiver Blutdruckmessung untersucht. Anschließend wurden die körperlich aktiven und inaktiven Tiere einer LAD (Left anterior descendens artery)-Ligatur zur Induktion eines anterolateralen Myokardinfarktes bzw. einer Sham-Operation unterzogen. Im Anschluss an eine 5-tägige Ruhephase, die ein Abheilen der Infarktstelle gewährleisten sollte, wurden die Mäuse weiterhin für 4 Wochen unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum Lauftraining gehalten und nachfolgend erneut morphologisch und funktionell charakterisiert. Die Laufleistung der Tiere belief sich nach LAD-Ligatur auf  $4,3 \pm 0,2$  km pro Tag, nach Sham-Operation auf  $4,7 \pm 0,2$  km pro Tag. Nach Tötung der Versuchstiere erfolgte die histologische und biochemische Determination des kardialen Phänotyps in den 4 Mausgruppen, sowie die Expressionsanalyse der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9, des Adenosinrezeptor-Systems und der Komponenten des PI3-Kinase-Signalwegs AKT, P70S6K, der GSK3 $\beta$ , sowie der MAP-Kinase ERK.



**Abb. 36: Studiendesign zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps und der Adenosinrezeptor-Expression nach Induktion pathologischer Hypertrophie in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen**

Männliche C57/Bl6N Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden für 6 Wochen unter Standardisierten Bedingungen („Sitzen“, Kontrolle) oder mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining (Läufer) gehalten. Nach Ablauf der 6 Wochen wurden die Tiere funktionell und morphologisch mittels Echokardiographie, MRT und Blutdruckmessung untersucht und anschließend einer LAD-Ligatur bzw. einer Sham-Operation unterzogen. Nach einer 5-tägigen Ruhephase nach Eingriff wurde das Lauftraining für weitere 4 Wochen fortgesetzt. Die Kontrollen wurden weiterhin unter Standardbedingungen gehalten. Nach Ablauf der 4 Wochen wurden die Tiere erneut morphologisch und funktionell charakterisiert und anschließend getötet. Nach Organentnahme erfolgte die biochemische und histologische Determination des kardialen Phänotyps, sowie die Expressionsanalyse der Komponenten des PI3Kinase/AKT-Signalwegs, des Adenosinrezeptor-Systems und der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9. Echo=Echokardiographie; LAD=“left anterior descendens artery“; OP=Operation

### 4.3.1 Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die kardiale Funktion und Morphologie

Ziel der Analyse war, den Einfluss von Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt auf den Remodeling-Prozess zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde der kardiale Phänotyp infarzierter, körperlich inaktiver (MI-Kontrolle) und körperlich aktiver (MI-Läufer) Mäuse bzw. sham-operierter, untrainierter (Sham-Kontrolle) und trainierter (Sham-Läufer) Versuchstiere echokardiographisch determiniert. Hierbei wurden die Dicken des interventrikulären Septums (IVS [mm]), der linksventrikulären Hinterwand (LVPW [mm]), der linksventrikulären Vorderwand (LVAW [mm]), die internen linksventrikulären Durchmesser in Enddiastole (LVEDD [mm]) und Endsystole (LVESD [mm]) gemessen, sowie linksventrikuläres Volumen (LV vol [μl]) und linksventrikuläre Masse (LV-Masse [mg]) kalkuliert. Als funktioneller Parameter wurde die Verkürzungsfraction (FS, „Fractional Shortening, %) ermittelt.

**Tabelle 31: Effekte körperlicher Aktivität vor und nach Induktion eines Myokardinfarktes auf funktionelle und morphologische, echokardiographisch determinierbare Parameter**

	<b>Sham-Kontrolle</b> <b>(n=7)</b>	<b>MI-Kontrolle</b> <b>(n=24)</b>	<b>Sham-Läufer</b> <b>(n=8)</b>	<b>MI-Läufer</b> <b>(n=18)</b>
<b>LVPW; d [μm] ± SEM</b>	0,48 ± 0,02	0,62 ± 0,02 *	0,62 ± 0,04 ×	0,66 ± 0,03
<b>LVAW; d [μm] ± SEM</b>	0,38 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,36 ± 0,02 *+
<b>IVS; d [μm] ± SEM</b>	0,46 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,03 *
<b>LVEDD [μm] ± SEM</b>	4,39 ± 0,06	4,99 ± 0,09 *	4,75 ± 0,08 ×	4,97 ± 0,19
<b>LVESD [μm] ± SEM</b>	3,50 ± 0,04	4,05 ± 0,10 *	3,90 ± 0,08 xx	4,09 ± 0,22
<b>LVED vol [μl] ± SEM</b>	87,20 ± 2,66	118,38 ± 5,07 *	105,44 ± 4,32 ×	121,22 ± 12,17
<b>LVES vol [μl] ± SEM</b>	50,93 ± 3,70	73,87 ± 4,59 *	66,39 ± 8,64 xxx	79,40 ± 12,18
<b>LV-Masse; d [mg] ± SEM</b>	56,94 ± 3,73	83,33 ± 4,71 *	73,95 ± 4,13 ×	80,51 ± 6,74
<b>FS [%] ± SEM</b>	20,18 ± 1,94	18,83 ± 0,99	17,80 ± 1,62	18,42 ± 1,21

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt; \*p<0,05 Sham vs. MI; +p<0,05 MI-Kontrolle vs. MI-Läufer; xp<0,05; xxxp<0,01 Sham-Kontrolle vs. Sham-Läufer; Ungepaarter T-Test; LV=Linksventrikulär; PW=Hinterwand; AW=Vorderwand; IVS=Interventrikuläres Septum; EDD/ESD=Enddiastolischer Durchmesser/Endsystolischer Durchmesser; ED/ES vol=Enddiastolisches/Endsystolisches Volumen; FS=Verkürzungsfraction; d=diastolisch

Die in Tabelle 31 aufgeführten Ergebnisse echokardiographischer Untersuchungen zeigen, dass in körperlich inaktiven Mäusen eine permanente LAD-Ligatur zur Induktion eines Vorderwandinfarktes zu einer Verdickung der linksventrikulären Hinterwand im Vergleich zur Sham-OP führte. Neben diesem kompensatorischen Umbau-

vorgang im infarzierten Herzen konnten die für den hypertrophen Phänotyp charakteristischen Zunahmen aller determinierter Kavitätsgrößen, sowie der LV-Masse in den MI-Kontrollen detektiert werden. Im Gegensatz dazu wies die MI-Laufgruppe lediglich eine Ausdünnung des IVS und der linksventrikulären Vorderwand gegenüber ihrer Sham-Gruppe auf. Das Ausbleiben eindeutiger Hinweise auf die Induktion einer pathologischen Hypertrophie beim vergleichenden Betrachten der untersuchten Parameter in den beiden Laufgruppen ist darauf zurück zu führen, dass diese Tiere bereits eine adaptive Hypertrophie entwickelt hatten und das Ausmaß der Hypertrophie anscheinend nicht durch das maladaptive kardiale Ereignis potenziert wurde. Das Vorliegen eines physiologisch hypertrophen Phänotyps in den Sham-Läufern wird besonders deutlich, wenn die beiden Sham-Gruppen miteinander verglichen werden. Hier bewirkte das Ausdauertraining im linken Ventrikel eine Verdickung der Hinterwand, eine Zunahme der internen Durchmesser, des enddiastolischen und endsystolischen Volumens und der ventrikulären Masse. Die beiden Infarktgruppen unterschieden sich lediglich darin, dass die Läufer eine ausgedünnte Vorderwand aufwiesen, was auf differentielle chronische Umbauvorgänge im Herzen in Abhängigkeit vom physischen Aktivitätsstatus hinweisen könnte. Die Verkürzungsfraktion als Maß für die systolische Funktion unterlag keiner Regulation in den 4 Versuchsgruppen.

Um die Auswirkungen einer bereits bestehenden adaptiven Hypertrophie auf den Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt und die unterschiedlichen kardialen Veränderungen in inaktiven und aktiven Mäusen, induziert durch permanente LAD-Ligatur, zu verdeutlichen, wurden echokardiographische Untersuchungsergebnisse von MI-Tieren vor Induktion des Infarktes (vor MI) und 4 Wochen nach Ligatur (post-MI) einander gegenüber gestellt (siehe Studiendesign in Abb. 36). Die Ergebnisse dieser Verlaufsbetrachtung sind in nachstehender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 32: Veränderungen morphologischer und funktioneller, echokardiographisch determinierbarer Parameter durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen**

	<u>Kontrolle vor MI</u> <b>(n=21)</b>	<u>Kontrolle post</u> <b>MI (n=24)</b>	<u>Läufer vor MI</u> <b>(n=22)</b>	<u>Läufer post MI</u> <b>(n=18)</b>
<b>LVPW; d [<math>\mu\text{m}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	0,57 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,02 *	0,59 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,03 *
<b>LVAW; d [<math>\mu\text{m}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	0,49 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02 **	0,48 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02 **+
<b>IVS; d [<math>\mu\text{m}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	0,47 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,02 *	0,49 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,03 **
<b>LVEDD [<math>\mu\text{m}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	4,34 $\pm$ 0,55	4,98 $\pm$ 0,09 **	4,67 $\pm$ 0,05 x	4,97 $\pm$ 0,19
<b>LVESD [<math>\mu\text{m}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	3,42 $\pm$ 0,06	4,05 $\pm$ 0,10 **	3,84 $\pm$ 0,06 xx	4,09 $\pm$ 0,22
<b>LVED vol [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	85,32 $\pm$ 2,50	118,38 $\pm$ 5,07 **	101,19 $\pm$ 12,13	121,22 $\pm$ 12,17
<b>LVES vol [<math>\mu\text{l}</math>] <math>\pm</math> SEM</b>	48,73 $\pm$ 5,92	73,87 $\pm$ 4,59****	64,15 $\pm$ 10,83	79,40 $\pm$ 12,18
<b>LV-Masse; d [mg] <math>\pm</math> SEM</b>	63,15 $\pm$ 1,74	83,33 $\pm$ 4,71 **	74,52 $\pm$ 1,91 xx	80,51 $\pm$ 6,74
<b>FS [%] <math>\pm</math> SEM</b>	21,19 $\pm$ 0,74	18,83 $\pm$ 0,99	17,75 $\pm$ 0,75	18,42 $\pm$ 1,21

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,001 vor MI vs. post MI; xp<0,05; xxp<0,01 Kontrolle vor MI vs. Läufer vor MI; +p<0,05 Kontrolle post MI vs. Läufer post MI; Ungepaarter T-Test; LV=Linksventrikulär; PW=Hinterwand; AW=Vorderwand; IVS=Interventrikuläres Septum; EDD/ESD=Enddiastolischer Durchmesser/Endsystolischer Durchmesser; ED/ES vol=Enddiastolisches/Endsystolisches Volumen; FS=Verkürzungsfraktion; d=diastolisch

Die in Tabelle 32 aufgeführten Ergebnisse bestätigen, dass die durch den Infarkt ausgelösten morphologischen Veränderungen in untrainierten Tieren deutlich stärker ausgeprägt waren als in trainierten Versuchstieren. So zeigte sich, dass körperlich inaktive Mäuse innerhalb von 4 Wochen typische Remodeling-Merkmale als Folgen eines anterolateralen Infarktes, wie die Ausdünnung der LVAW und des IVS aufwiesen. Weiterhin kam es zur Ausbildung einer ausgeprägten Hypertrophie, gekennzeichnet durch signifikante Zunahmen der internen linksventrikulären Durchmesser, des diastolischen und endsystolischen LV-Volumens und der LV-Masse. Im Gegensatz dazu erlitten die trainierten Versuchstiere, im Verlauf betrachtet, lediglich eine infarktbedingte Verdickung der LVPW, sowie eine vergleichsweise stärkere Ausdünnung der Vorderwand und des Septums. Auch hier zeigte sich beim Vergleich der beiden Mausgruppen zum Zeitpunkt vor Induktion des Infarktes die deutliche Ausprägung einer physiologischen Hypertrophie in den Läufern nach 6-wöchigem Training anhand vergrößerter interner Durchmesser und der Massenzunahme. Enddiastolisches und endsystolisches Volumen waren nach 6-wöchigem freiwilligem Training noch nicht vergrößert. Dieses Hypertrophie-Merkmal scheint im Versuch erst nach einer 10-wöchigen Trainingsphase ausgeprägt worden zu sein (siehe Tabelle 31).

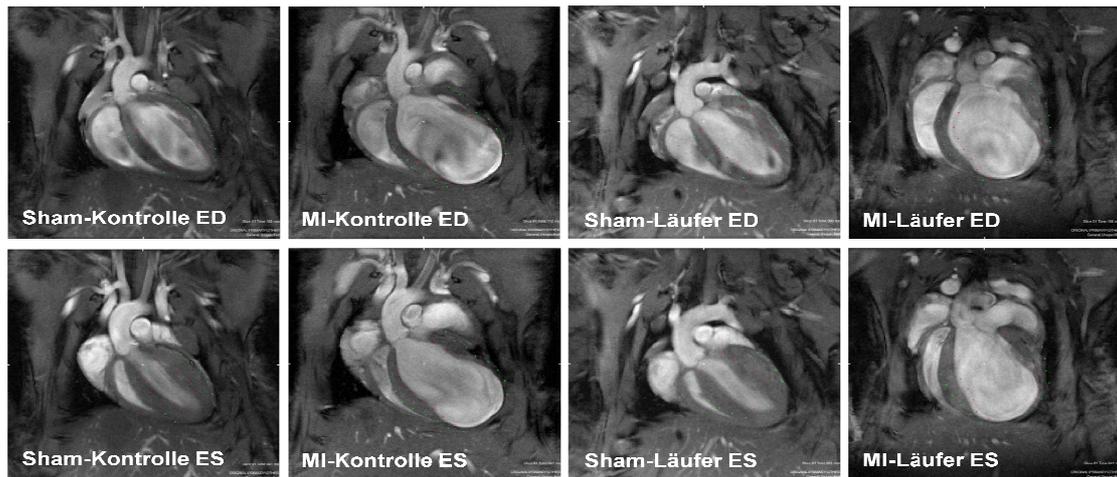
Die Verkürzungsfraction, als Maß für die systolische Funktion, blieb in den Versuchstieren nach 4-wöchiger LAD-Ligatur erhalten.

Zur näheren Betrachtung der Effekte körperlicher Aktivität auf morphologische und funktionelle Veränderungen, ausgelöst durch einen Myokardinfarkt, wurden weiterhin vorrangig die Versuchstiere mit großen Vorderwandinfarkten im kardialen MRT charakterisiert. Hierbei wurden, wie schon im Falle der echokardiographischen Untersuchungen, die Untersuchungsergebnisse der Infarkttiere mit denen ihrer Sham-operierten Entsprechungen (Tabelle 33) und mit den Untersuchungsergebnissen trainierter und untrainierter Mäuse vor Induktion des Infarktes (Tabelle 34) verglichen.

**Tabelle 33: Effekte körperlicher Aktivität vor und nach Induktion eines Myokardinfarktes auf funktionelle und morphologische, im MRT determinierbare Parameter**

	<u>Sham-Kontrolle</u> (n=5)	<u>MI-Kontrolle</u> (n=7)	<u>Sham-Läufer</u> (n=5)	<u>MI-Läufer</u> (n=8)
<b>LV-Masse [mg] ± SEM</b>	71,47 ± 7,46	89,03 ± 7,99	76,83 ± 2,03	87,43 ± 9,36
<b>LV-Masse [μl] ± SEM</b>	68,06 ± 7,10	84,79 ± 7,61	73,18 ± 1,93	83,27 ± 8,92
<b>LVED vol [μl] ± SEM</b>	50,25 ± 4,38	103,53 ± 17,25 *	65,91 ± 0,90 xx	92,68 ± 14,28
<b>LVES vol [μl] ± SEM</b>	19,10 ± 2,07	74,55 ± 18,70 *	31,07 ± 0,52 xx	59,36 ± 13,96
<b>SV [μl] ± SEM</b>	31,16 ± 2,92	36,44 ± 1,68	34,83 ± 1,20	33,32 ± 2,95
<b>HZV [ml/min] ± SEM</b>	14,40 ± 2,27	16,38 ± 1,02	14,99 ± 1,11	15,94 ± 1,88
<b>EF [%] ± SEM</b>	62,09 ± 2,66	41,35 ± 5,82 *	52,79 ± 1,21 x	40,83 ± 5,82
<b>Herzfrequenz ± SEM</b>	460 ± 43	449 ± 16	433 ± 33	475 ± 32

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt; \*p<0,05 vs. Sham; xp<0,05; xxp<0,01 Sham-Kontrolle vs. Sham-Läufer; Ungepaarter T-Test; LV=Linksventrikulär; ED/ES vol=Enddiastolisches/Endsystolisches Volumen; ESV; SV=Schlagvolumen; HZV=Herzzeitvolumen; EF=Ejektionsfraktion



**Abb. 37: Exemplarische Vierkammerblicke untrainierter und trainierter Mäuse 4 Wochen nach Infarktinduktion bzw. Sham-Operation**

Exemplarische MRT-Aufnahmen im „Bright-Blood“-Modus in Längsachsenprojektion (Vierkammerblick) untrainierter (Kontrolle) und trainierter (Läufer) C57Bl6N Mäuse 4 Wochen nach Infarktinduktion bzw. Sham-Operation in der Enddiastole (ED; Obere Bildreihe) und in der Endsystole (ES; Untere Bildreihe). MI=Myokardinfarkt

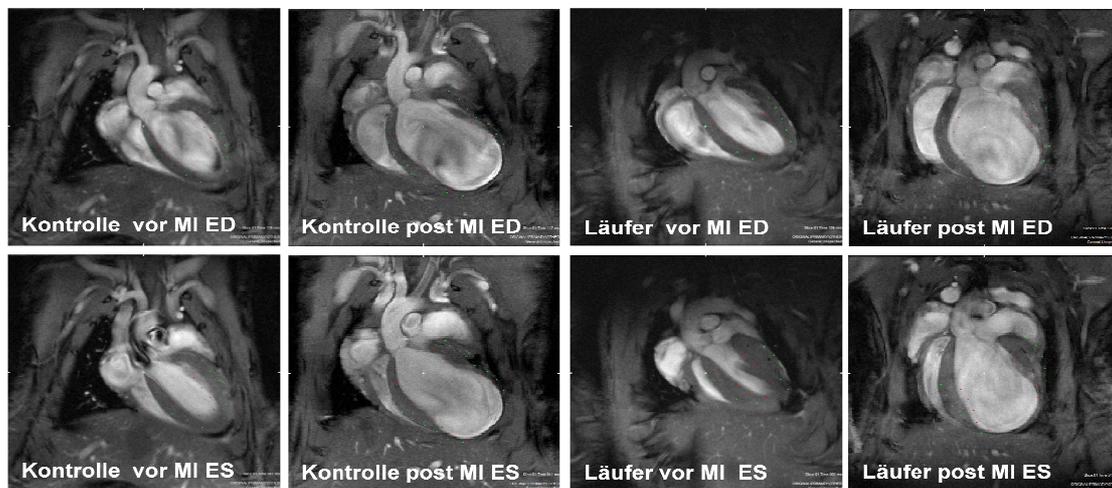
Die in Tabelle 33 dargestellten Ergebnisse der kardialen MRT-Analysen bestätigten die bereits in den echokardiographischen Analysen (Tabelle 31) beobachteten Zunahmen der enddiastolischen und endsystolischen Volumina und tendenziell der linksventrikulären Masse als Resultat der permanenten LAD-Ligatur in körperlich inaktiven Mäusen. Weiterhin zeigte sich eine Abnahme der Ejektionsfraktion gegenüber den untrainierten Sham-Tieren. Somit resultierte der Myokardinfarkt in untrainierten Versuchstieren in der deutlichen Induktion des pathologisch hypertrophen Phänotyps. Die Ausprägung der genannten infarktinduzierten Hypertrophie-Marker wurde ebenfalls tendenziell beim Vergleich zwischen trainierten, sham-operierten Mäusen und trainierten Infarkttieren sichtbar, verfehlte jedoch, wie bereits in den echokardiographischen Analysen, statistische Signifikanz. Die permanente Koronararterienokklusion führte in körperlich inaktiven Mäusen tendenziell zur stärkeren Zunahme der enddiastolischen und endsystolischen Volumina als in aktiven Mäusen, es lagen jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede im Ausmaß der pathologisch hypertrophen Antwort zwischen den beiden Infarktgruppen vor. Die Induktion der physiologischen Hypertrophie in den Sham-Läufern wurde, wie bereits in den echokardiographischen Untersuchungsergebnissen dokumentiert (Tabelle 31), durch Zunahme der enddiastolischen und endsystolischen Volumina gegenüber den Sham-Kontrollen deutlich. Darüberhinaus führte das Ausdauertraining per se zu einer geringen Abnahme der Auswurfraction, was ebenfalls bereits in Athleten beobachtet

wurde und keine pathologische Relevanz besitzt. Herzfrequenz, Schlagvolumen und Herzminutenvolumen unterlagen keinem Einfluss durch die hypertrophen Stimuli.

**Tabelle 34: Veränderungen morphologischer und funktioneller, im MRT- determinierbarer Parameter durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen**

	<u>Kontrolle vor MI</u> (n=6)	<u>Kontrolle post MI</u> (n=7)	<u>Läufer vor MI</u> (n=5)	<u>Läufer post MI</u> (n=8)
<b>LV-Masse [mg] ± SEM</b>	61,62 ± 2,91	89,03 ± 7,99 *	60,63 ± 3,14	87,43 ± 9,36
<b>LV-Masse [μl] ± SEM</b>	58,69 ± 2,77	84,79 ± 7,61 *	73,23 ± 3,98	83,27 ± 8,92
<b>LVED vol [μl] ± SEM</b>	53,97 ± 1,34	103,53 ± 17,25 *	58,72 ± 4,33	92,68 ± 14,28
<b>LVES vol [μl] ± SEM</b>	29,15 ± 2,63	74,55 ± 18,70 *	25,68 ± 2,47	59,36 ± 13,96
<b>SV [μl] ± SEM</b>	24,82 ± 1,79	36,44 ± 1,68 **	33,03 ± 2,26 ×	33,32 ± 2,95
<b>HZV [ml/min] ± SEM</b>	13,45 ± 0,94	16,38 ± 1,02	16,13 ± 1,85	15,94 ± 1,88
<b>EF [%] ± SEM</b>	46,40 ± 4,14	41,35 ± 5,82	56,56 ± 1,71	40,83 ± 5,82
<b>Herzfrequenz ± SEM</b>	548 ± 9 ***	449 ± 16	465 ± 34	475 ± 32

Die Daten sind als Mittelwerte±SEM dargestellt; \*p<0,05 \*\* p<0,01 vor MI vs. post MI; ×p<0,05 Kontrolle vor MI vs. Läufer vor MI; Ungepaarter T-Test; LV=Linksventrikulär; ED/ES vol=Enddiastolisches/Endsystolisches Volumen; ESV; SV=Schlagvolumen; HZV=Herzzeitvolumen; EF=Ejektionsfraktion



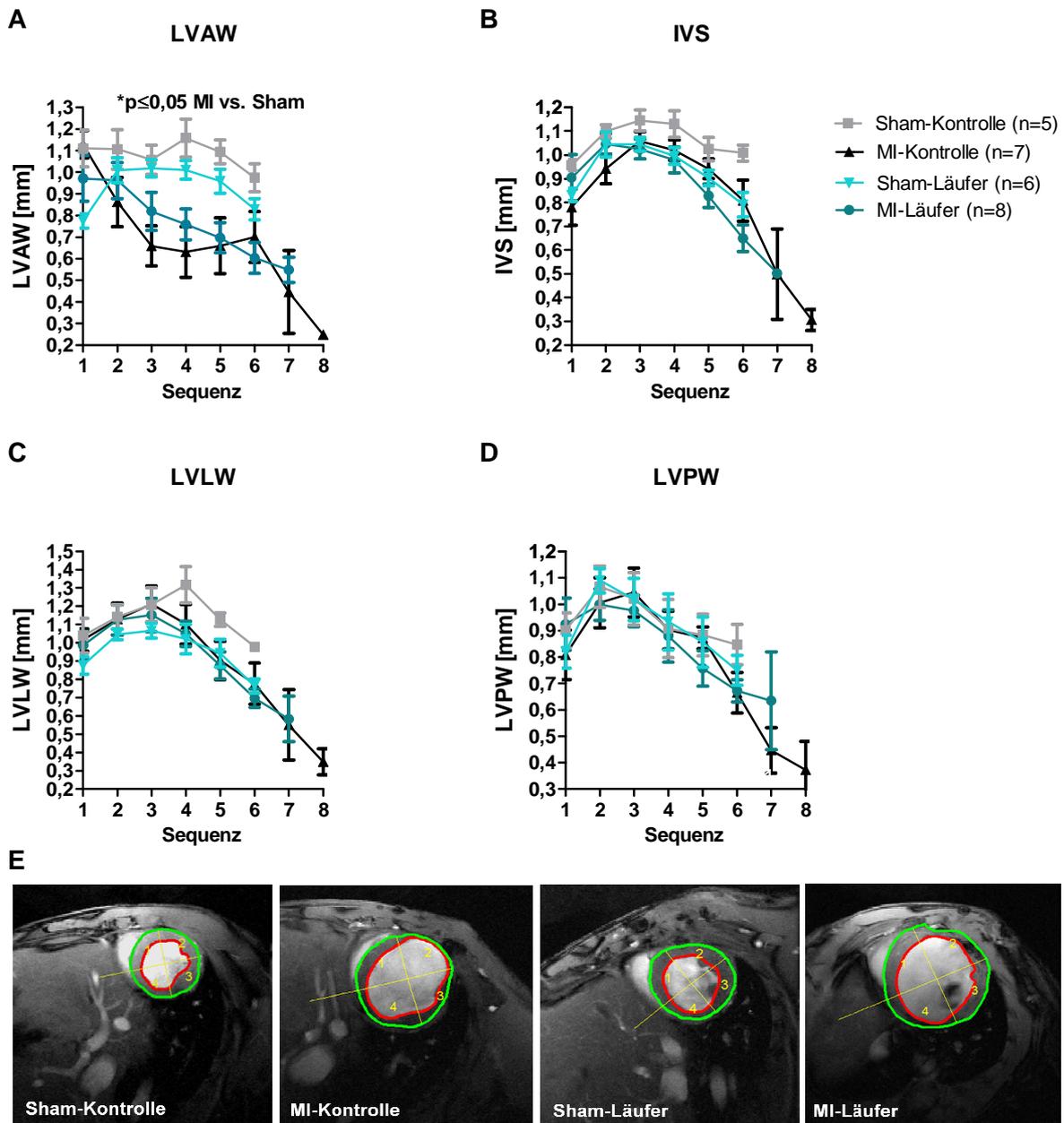
**Abb. 38: Exemplarische Vierkammerblicke untrainierter und trainierter Mäuse vor und 4 Wochen nach Infarktinduktion**

Exemplarische MRT-Aufnahmen im „Bright-Blood“-Modus in Längsachsenprojektion (Vierkammerblick) untrainierter (Kontrolle) und trainierter (Läufer) C57Bl6N Mäuse vor und 4 Wochen nach Infarktinduktion in der Enddiastole (ED; Obere Bildreihe) und in der Endsystole (ES; Untere Bildreihe). MI=Myokardinfarkt

Konsistent mit den Ergebnissen der echokardiographischen Untersuchungen (siehe Tabelle 32), zeigte sich beim Vergleich von trainierten und untrainierten Tieren vor Infarktinduktion und 4 Wochen nach dem operativen Eingriff (siehe Tabelle 34), dass

körperlich inaktive Mäuse innerhalb von 4 Wochen typische hypertrophe Merkmale als Folgen eines anterolateralen Infarktes, wie die Zunahme des diastolischen und endsystolischen LV-Volumens und der LV-Masse, aufwiesen. Dieser Trend konnte, wie schon in den echokardiographischen Analysen gezeigt (siehe Tabelle 32), auch in den trainierten Infarkttieren beobachtet werden, verfehlte aber auch unter Verwendung dieses Bildgebungsverfahrens statistische Signifikanz. Weiterhin bestätigen die hier dargestellten MRT-Ergebnisse die Resultate der Echokardiographie (siehe Tabelle 32), dass 6-wöchiges Lauftraining nicht ausreichte, um eine Zunahme der enddiastolischen und endsystolischen Volumina zu verzeichnen. Dieses Hypertrophie-Merkmal scheint im Versuch erst nach einer 10-wöchigen Trainingsphase ausgeprägt worden zu sein (siehe Tabelle 31 und 32). Die Auswurfraction als Maß für die systolische Funktion blieb in den Tieren nach 4-wöchiger LAD-Ligatur erhalten.

Um den Einfluss des Vorderwandinfarktes auf die kardiale Architektur in Abhängigkeit vom körperlichen Aktivitätsstatus näher zu untersuchen, wurden weiterhin die linksventrikulären Wanddicken in den MRT-Kurzachsenprojektionen gemessen. Bei den bereits dargestellten echokardiographischen Ausmessungen der Wanddicken erfolgte die Vermessung des interventrikulären Septums (IVS) und der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) in eindimensionalen, mittventrikulären Längsachsenprojektionen, die Vermessung der Vorderwand (LVAV) in der eindimensionalen, mittventrikulären Kurzachsenprojektion. Im Gegensatz dazu erlaubt das MRT die hochauflösende, zweidimensionale Darstellung und Vermessung aller linksventrikulären Wände, inklusive der Lateralwand (LVLW), in der Kurzachsenprojektion. Weiterhin ermöglicht dieses Bildgebungsverfahren die Beurteilung der geometrischen Wandveränderungen im gesamten Ventrikel. Die Vermessung der Wände erfolgte im MRT somit in allen konsekutiven Sequenz-Aufnahmen, die zur gesamten Projektion des jeweiligen Herzens notwendig waren. Üblicherweise bedurfte es 6-8 konsekutiver Sequenzen der Schichtdicke 1 mm, um den Ventrikel von der Klappenebene (Sequenz 1) bis hin zum Apex (je nach Herzgröße Sequenz 6, 7 oder 8) darzustellen. Die jeweiligen Wanddicken wurden pro Tier und pro Sequenz in einem gesamten R-R-Intervall gemessen und pro Wandbereich gemittelt. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen für die jeweilige Wand in den aufeinanderfolgenden Sequenzen sind in nachfolgender Abbildung dargestellt. Auch hier erfolgte weiterhin der Vergleich der Messresultate von Infarkttieren vor und nach dem operativen Eingriff (Abb. 40).

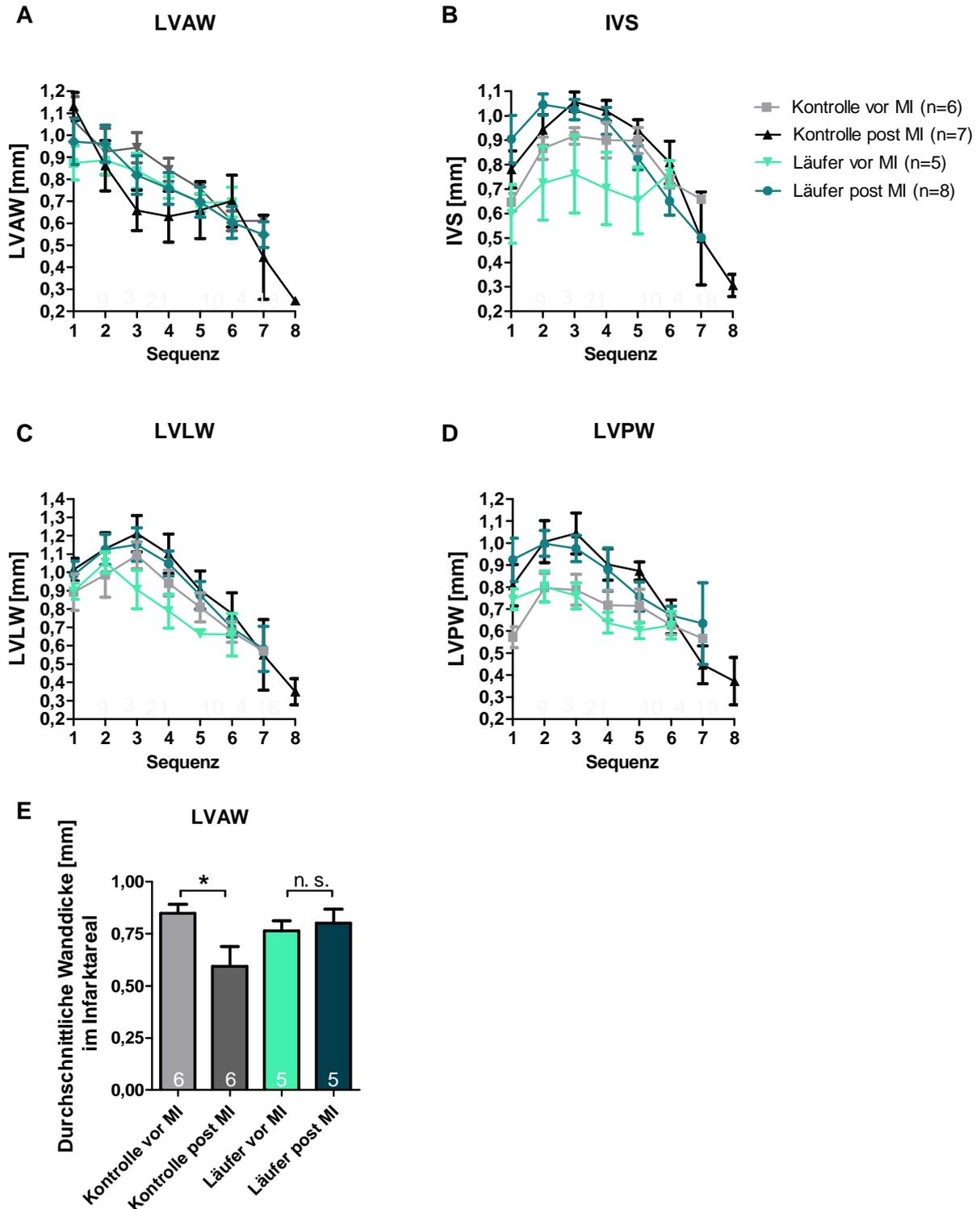


**Abb. 39: Induktion eines anterolateralen Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven Tieren tendenziell zur stärkeren Ausdünnung der linksventrikulären Vorderwand**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurden die Dicken der (A) LVAW, (B) des IVS, (C) der LVLW und (D) der LVPW anhand konsekutiver MRT-Kurzachsenprojektionen (Schichtdicke pro Sequenz: 1 mm) von der Klappenebene (Sequenz 1) bis zum Apex (je nach Herzgröße Sequenz 6, 7 oder 8) vermessen (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt; \* p<0,05 vs. Sham; One-Way-Anova Analyse mit Bonferroni Post-Test). (E) Exemplarische MRT-Aufnahmen der mittventrikulären Sequenz im „Bright-Blood“-Modus in Kurzachsenprojektion (Zweikammerblick) untrainierter (Kontrolle) und trainierter (Läufer) C57Bl6N Mäuse 4 Wochen nach Infarktinduktion (MI) bzw. Sham-Operation (Sham) mit Kennzeichnung der Wandeinteilung (Epikard: Grün; Endokard: Rot) in IVS (Interventrikuläres Septum, Sektor 1), LVAW (Linksventrikuläre Vorderwand, Sektor 2), LVLW (Linksventrikuläre Lateralwand, Sektor 3) und LVPW (Linksventrikuläre Hinterwand, Sektor 4). MI=Myokardinfarkt

---

Die in Abb. 39 dargestellten Ausmessungen linksventrikulärer Wände zeigen, dass die Induktion des Vorderwandinfarktes, wie bereits in den echokardiographischen Untersuchungsergebnissen gezeigt (Tabelle 31), sowohl in körperlich inaktiven, als auch in körperlich aktiven Versuchstieren zur deutlichen Ausdünnung der Vorderwand distal der LAD-Ligatur (ab Sequenz 2) führte. Dieser maladaptive chronische ventrikuläre Umbauprozess war in trainierten Infarkttieren tendenziell abgemildert (Siehe auch Abb. 38 E). Die infarktbedingte und Ausdauersport-induzierte Verdickung der Hinterwand (Tabelle 31), als Markenzeichen des hypertrophierten Herzens, konnte in diesem Bildgebungsverfahren nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass zur Darstellung des gesamten linken Ventrikels in den untrainierten Infarkttieren 8 konsekutive Sequenzaufnahmen der Schichtdicke 1 mm notwendig waren, für die Aufnahme des linken Ventrikels der trainierten Infarkttiere nur 7 Sequenzen, weist neben den bereits beschriebenen Untersuchungsergebnissen der beiden Bildgebungsverfahren (Tabelle 31, 32, 33, 34) erneut darauf hin, dass die Hypertrophie und die LV-Dilatation in untrainierten Infarkttieren tendenziell stärker ausgeprägt war als in trainierten Infarkttieren.



**Abb. 40: Ausdauertraining schützt vor infarktinduzierter Ausdünnung der Vorderwand**

In trainierten (Läufer) und untrainierten (Kontrollen) C57/Bl6 Mäusen wurden vor (Vor) und 4 Wochen nach (Post) Induktion eines Myokardinfarktes (MI) die Dicken der (A) LVAW, (B) des IVS, (C) der LVLW und (D) der LVPW anhand konsekutiver MRT-Kurzachsenprojektionen (Schichtdicke pro Sequenz: 1 mm) von der Klappenebene (Sequenz 1) bis zum Apex (je nach Herzgröße Sequenz 6, 7 oder 8) vermessen. (E) Durchschnittliche Vorderwanddicke im Infarktareal der 4 Behandlungsgruppen (Sequenz 3-5; die Daten sind als Mittelwerte ± SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt; \* p<0,05 vor MI vs. post MI; Gepaarter T-Test). LV=Linksventrikulär; AW=Vorderwand; IVS=Interventrikuläres Septum; LW=Lateralwand; PW=Hinterwand

Die in Abb. 40 dargestellten Ausmessungen linksventrikulärer Wände deuten daraufhin, dass eine 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in untrainierten Versuchstieren eine deutliche Vorderwandausdünnung (Abb. 40 A) provozierte. Im Gegensatz dazu unterlag die Geometrie der Vorderwand keinem Einfluss durch die Koronarokklusion in körperlich aktiven Mäusen. Diese Ausdauertraining-abhängige Prävention des maladaptiven Umbauprozesses der Vorderwand wird besonders deutlich bei Betrachtung der durchschnittlichen Wanddicke im Infarktareal, d. h. in den Sequenzen 3-5 identischer Infarkttiere vor und nach Induktion des Myokardinfarktes (Abb. 40 E). Weiterhin zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass der Vorderwandinfarkt, wie schon in den Ergebnissen eindimensionaler, echokardiographischer Ausmessungen gezeigt (Tabelle 31), nach 4 Wochen in beiden Infarktgruppen zu einer tendenziellen Verdickung der linksventrikulären Hinterwand führte. Darüberhinaus konnte eine infarktinduzierte Diameterzunahme des interventrikulären Septums in den beiden mittventrikulären Sequenzen der beiden Infarktgruppen beobachtet werden, wobei echokardiographische Untersuchungen eine infarktbedingte Ausdünnung dieses Wandbereichs demonstrierten. Die Architektur der Lateralwand blieb, unabhängig vom Aktivitätszustand der Tiere, weitgehend unbeeinflusst von der permanenten Koronarokklusion.

Zusammengefasst zeigen die vorrangigen Resultate der angewandten Bildgebungsverfahren zum Einen, dass sowohl der physiologische Stimulus des Ausdauertrainings, als auch die permanente Koronarokklusion zur Ausprägung der myokardialen Hypertrophie führte. Zum Anderen lieferten die Analysen keinen Hinweis auf einen Einfluss von vor und nach Infarktinduktion durchgeführtem Ausdauertraining auf die kardiale Funktion oder das Ausmaß der infarktinduzierten Massenzunahme und LV-Dilatation. Bezüglich der kardialen Architektur jedoch demonstrierten MRT-Untersuchungen, dass freiwilliges Laustraining vor und nach großem Vorderwandinfarkt zu einer tendenziellen Abschwächung der Vorderwandausdünnung im gesamten Ventrikel führte. Weiterhin lieferte die vergleichende Betrachtung der Versuchstiere vor Infarktinduktion und der für 10 Wochen trainierten Tiere 4 Wochen nach LAD-Ligatur keinerlei Hinweise auf geometrische Veränderungen der Vorderwand. Hingegen war dieser maladaptive Umbauprozess bei der Verlaufsbetrachtung untrainierter Infarkttiere, vor allem im Infarktareal, deutlich ausgeprägt. Diese Beobachtungen könnten somit darauf hinweisen, dass früh nach großem anterolateralen Infarkt

initiiertes Lauftraining die transmurale Narbenausdünnung abschwächt und die Aufrechterhaltung der kardialen Architektur unterstützt.

Zur Charakterisierung der hämodynamischen Effekte einer permanenten LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen wurden die beiden Infarktgruppen, sowie die Sham-operierten Versuchstiere einer nicht-invasiven Blutdruckmessung unterzogen (Tabelle 35). Um die hämodynamischen Effekte des Myokardinfarktes in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen im Verlauf näher zu beleuchten, wurden weiterhin die Ergebnisse der Blutdruckmessungen von Infarkttieren vor und nach Induktion des Myokardinfarktes einander gegenüber gestellt (Tabelle 36).

**Tabelle 35: Hämodynamische Effekte einer 4-wöchigen permanenten LAD-Ligatur in Abhängigkeit des physischen Aktivitätsstatus**

	<u>Sham-Kontrolle</u> (n=5)	<u>MI-Kontrolle</u> (n=20)	<u>Sham-Läufer</u> (n=5)	<u>MI-Läufer</u> (n=15)
<b>Systole [mmHg] ± SEM</b>	112 ± 3	113 ± 3	117 ± 1	111 ± 3
<b>Diastole [mmHg] ± SEM</b>	78 ± 1	84 ± 3 +	86 ± 2 ×	75 ± 5 *
<b>Herzfrequenz [bpm] ± SEM</b>	542 ± 61	526 ± 10 ++	704 ± 44	615 ± 16

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. Sham; +p<0,05; p<0,01 MI-Kontrolle vs. MI-Läufer; ×p<0,05 Sham-Kontrolle vs. Sham-Läufer; Ungepaarter T-Test; MI=Myokardinfarkt; bpm="beats per minute"=Schläge pro min

**Tabelle 36: Hämodynamische Veränderungen, induziert durch 4-wöchige permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen**

	<u>Kontrolle vor MI</u> (n=54)	<u>Kontrolle post MI</u> (n=20)	<u>Läufer vor MI</u> (n=39)	<u>Läufer post MI</u> (n=15)
<b>Systole [mmHg] ± SEM</b>	118 ± 2	113 ± 3	116 ± 2	111 ± 3
<b>Diastole [mmHg] ± SEM</b>	84 ± 2	84 ± 3 +	84 ± 2	75 ± 5 *
<b>Herzfrequenz [bpm] ± SEM</b>	499 ± 9	526 ± 10 ++	526 ± 10 ×	615 ± 16 **

Die Daten sind als Mittelwerte±SEM dargestellt; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vor MI vs. post MI; +p<0,05; p<0,01 Kontrolle post MI vs. Läufer post MI; ×p<0,05; ×p<0,01 Kontrolle vor MI vs. Läufer vor MI; Ungepaarter T-Test; MI=Myokardinfarkt, bpm="beats per minute"=Schläge pro min

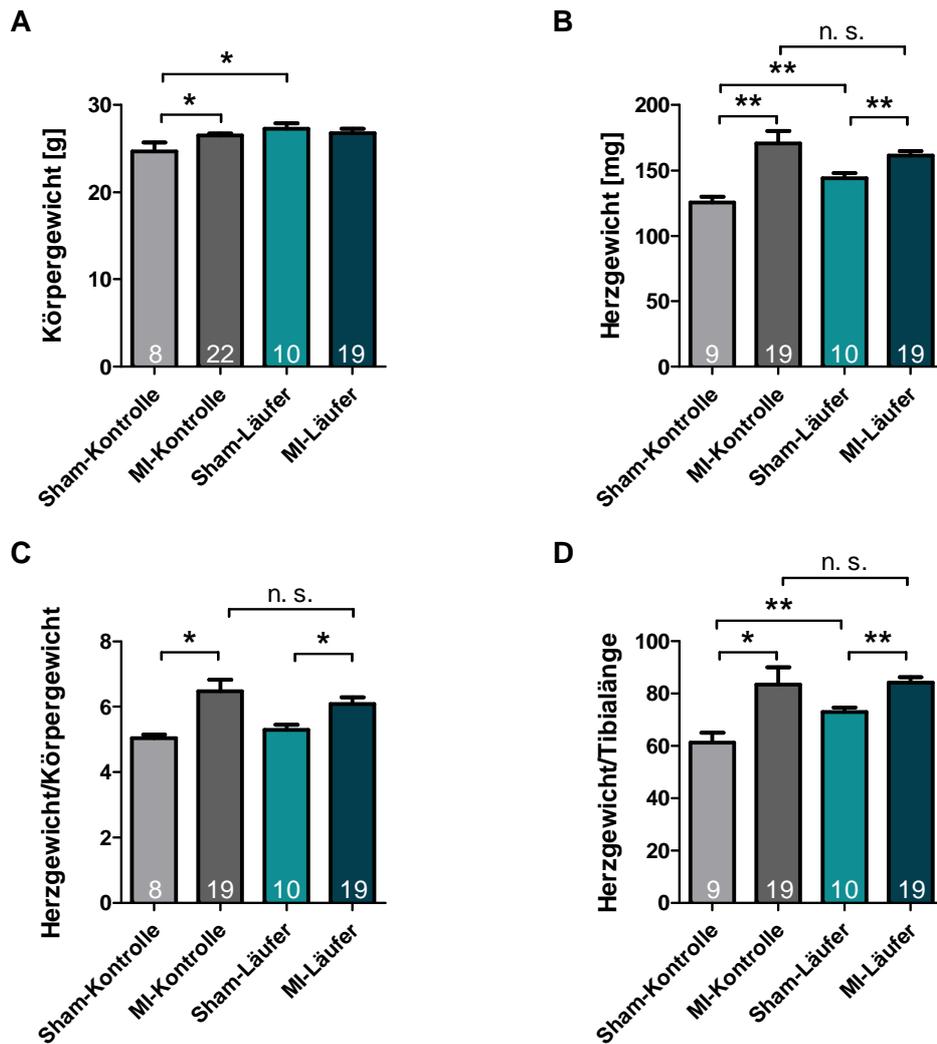
Die Resultate der Blutdruckmessungen zeigen, dass der systolische Wert unverändert blieb, unabhängig von der Induktion eines Myokardinfarktes und von der Dauer des physiologischen Stimulus (6 Wochen Ausdauertraining bei Läufern vor MI; 10 Wochen Ausdauertraining bei Läufern post MI). Bezüglich des diastolischen Wertes führte der Myokardinfarkt in den MI-Läufern und darauf folgende 4 Wochen fortwäh-

---

rende Aktivität zu einer Druckverminderung, der Myokardinfarkt in körperlich inaktiven Mäusen hingegen führte zur Druckzunahme gegenüber den Sham-Referenzen. Aufgrund der geringen Unterschiede der gemessenen diastolischen Werte innerhalb der Gruppen, die keinen Hinweis auf eine pathologische Relevanz liefern, könnten diese auf individuelle Schwankungen zurückzuführen sein. Die Herzfrequenz war nach Ligatur in den Läufern gegenüber den ligierten Kontrollen und gegenüber den Läufern vor MI erhöht, nicht jedoch gegenüber den Sham-Läufern. Darüber hinaus, zeigte sich auch eine erhöhte Frequenz in den Läufern vor MI verglichen mit den Kontrollen vor MI und tendenziell in den Sham-Läufern verglichen mit den Sham-Kontrollen.

#### **4.3.2 Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die Kardiomyozyten-Hypertrophie**

Im Anschluss an die Charakterisierung der myokardialen Funktion und Geometrie der Versuchstiere *in vivo* wurde der kardiale Phänotyp, resultierend aus den unterschiedlichen Behandlungen, determiniert. Hierzu wurden zunächst das Herzgewicht, das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis und die Herzgewicht/Tibiallänge-Ratio bestimmt, deren Zunahmen als typische Merkmale des hypertrophen Phänotyps gelten.



**Abb. 41: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven und aktiven Mäusen zur Ausprägung morphologischer Hypertrophie-Marker**

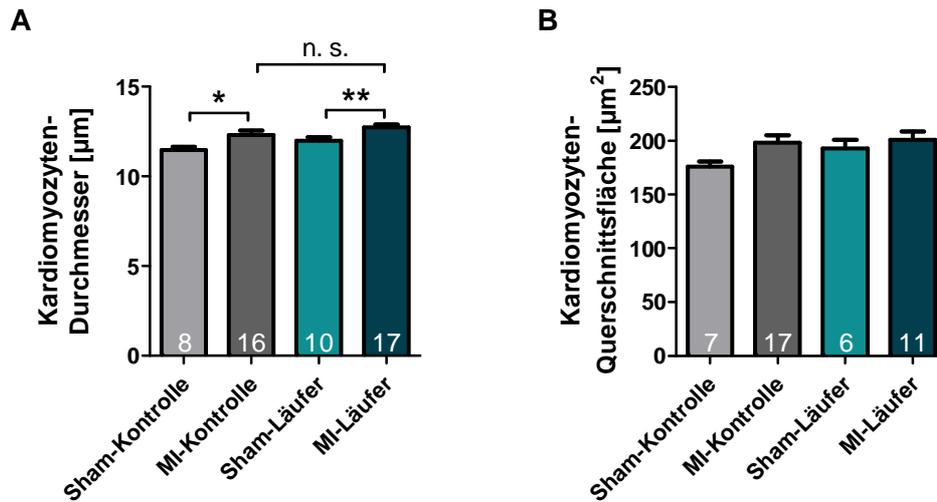
Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde (A) das Körpergewicht in g, (B) das Herzgewicht in mg und die Tibialänge in cm bestimmt, um nachfolgend (C) das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis sowie die (D) Herzgewicht/Tibialänge-Ratio zu ermitteln (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n. s. = nicht signifikant; Ungepaarter T-Test). MI=Myokardinfarkt

Aus Abb. 41 geht hervor, dass der hypertrophe Phänotyp in untrainierten und trainierten Infarktieren via Zunahme des Herzgewichtes, der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio und des Herzgewicht/Tibialänge-Verhältnisses gegenüber ihren Sham-operierten Referenzen verifiziert werden konnte. Weiterhin zeigt sich, dass sowohl körperliche Aktivität, als auch die permanente LAD-Ligatur zur Gewichtszunahme der Versuchstiere führte. Da es sich bei den untersuchten Hypertrophie-Markern sowohl um Charakteristika des pathologisch hypertrophen, als auch

---

des physiologisch hypertrophen Phänotyps handelt, war die Ausprägung der hypertrophen Antwort in trainierten Infarkttieren gegenüber ihren Sham-Entsprechungen aufgrund der bereits bestehenden physiologischen Hypertrophie der Sham-Läufer geringer ausgeprägt. Das Ausdauertraining besaß jedoch keinen eindeutigen Einfluss auf das Ausmaß der hypertrophen Antwort nach Infarktinduktion. Das Vorliegen einer physiologischen Hypertrophie in den Sham-Läufern zeigte sich in der Zunahme des Herzgewichtes und des Herzgewicht/Tibiallänge-Verhältnisses gegenüber den Sham-Kontrollen. Es lässt sich jedoch anhand dieser Daten alleine nicht determinieren inwiefern die hypertrophe Antwort in den trainierten Infarkttieren das Resultat des adaptiven oder des maladaptiven pro-hypertrophen Stimulus repräsentiert. Bestimmung der Feucht- und Trockengewichte von Lunge, Leber, Milz und Niere lieferten keine Hinweise auf Ödembildungen in den Infarktgruppen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben, zeichnet sich der hypertrophe Phänotyp neben den untersuchten makroskopischen morphologischen Veränderungen in erster Linie durch die Kardiomyozyten-Hypertrophie, d. h. durch die Zunahmen von Kardiomyozyten-Durchmesser und –Querschnittsfläche aus.

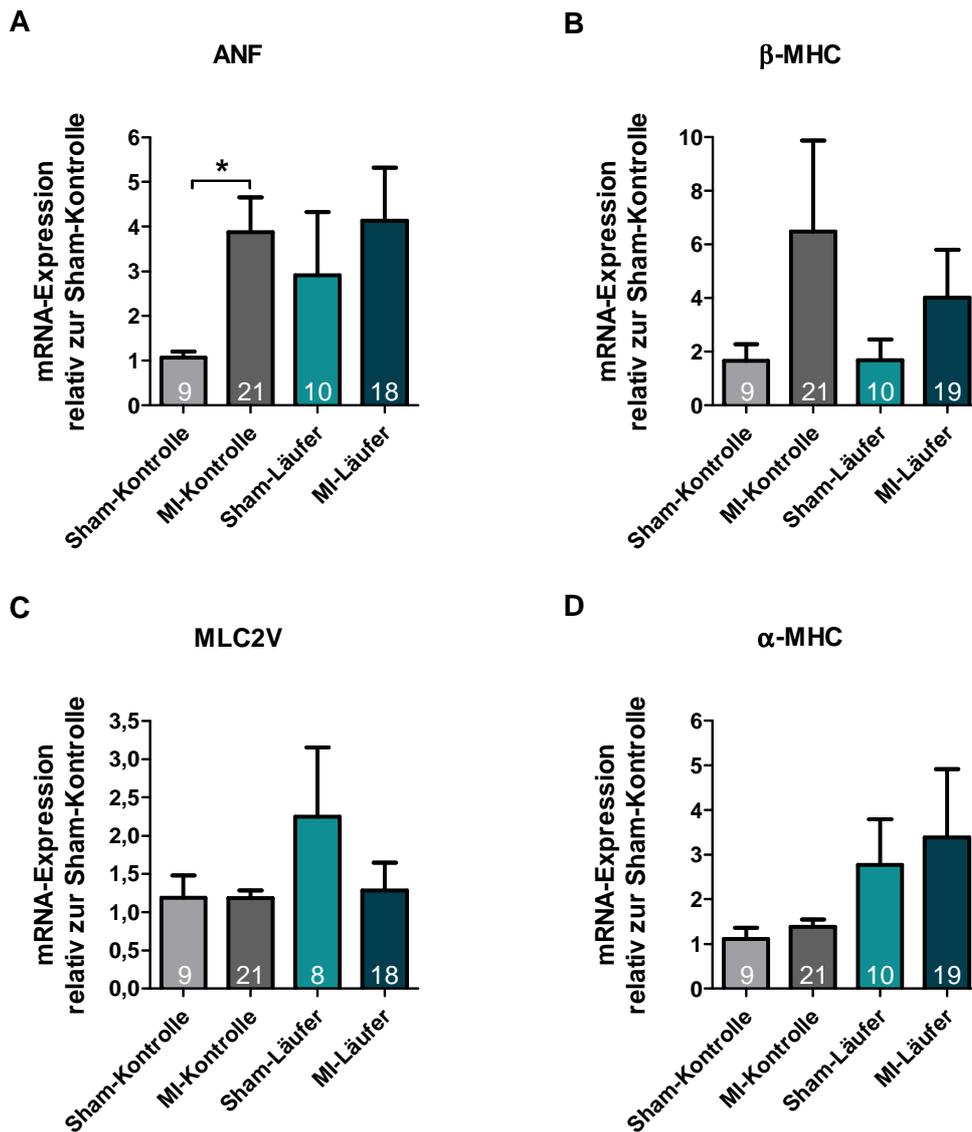


**Abb. 42: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich inaktiven und aktiven Mäusen zur Zunahme des Kardiomyozyten-Durchmessers**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurden (A) Durchmesser in  $\mu\text{m}$  und (B) Querschnittsfläche in  $\mu\text{m}^2$  HE-gefärbter Kardiomyozyten in 40-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgemessen (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant; Ungepaarter T-Test). MI=Myokardinfarkt

Die histologische Ausmessung der Kardiomyozyten ergab, dass in trainierten und untrainierten Mäusen eine Durchmesser-Zunahme der Herzmuskelzellen in Folge eines Myokardinfarktes induziert wurde. Dieser Trend konnte auch bezüglich der Querschnittsfläche beobachtet werden. Auch hier wird die sportinduzierte adaptive Hypertrophie bei vergleichender Betrachtung der beiden Sham-Gruppen deutlich. Die Ausprägung der hypertrophen Antwort in den Infarkttieren unterlag keiner Regulation durch den Ausdauersport.

Neben den betrachteten morphologischen Veränderungen ist der ventrikuläre maladaptive Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt von der Re-Aktivierung des fetalen Gen-Programms gekennzeichnet. Um nun einen eventuellen kardioprotektiven Effekt des Ausdauertrainings auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der fetalen Gene ANF,  $\beta$ -MHC und MLC2V, sowie des adulten, kontraktiven Myosinfilaments  $\alpha$ -MHC untersucht.



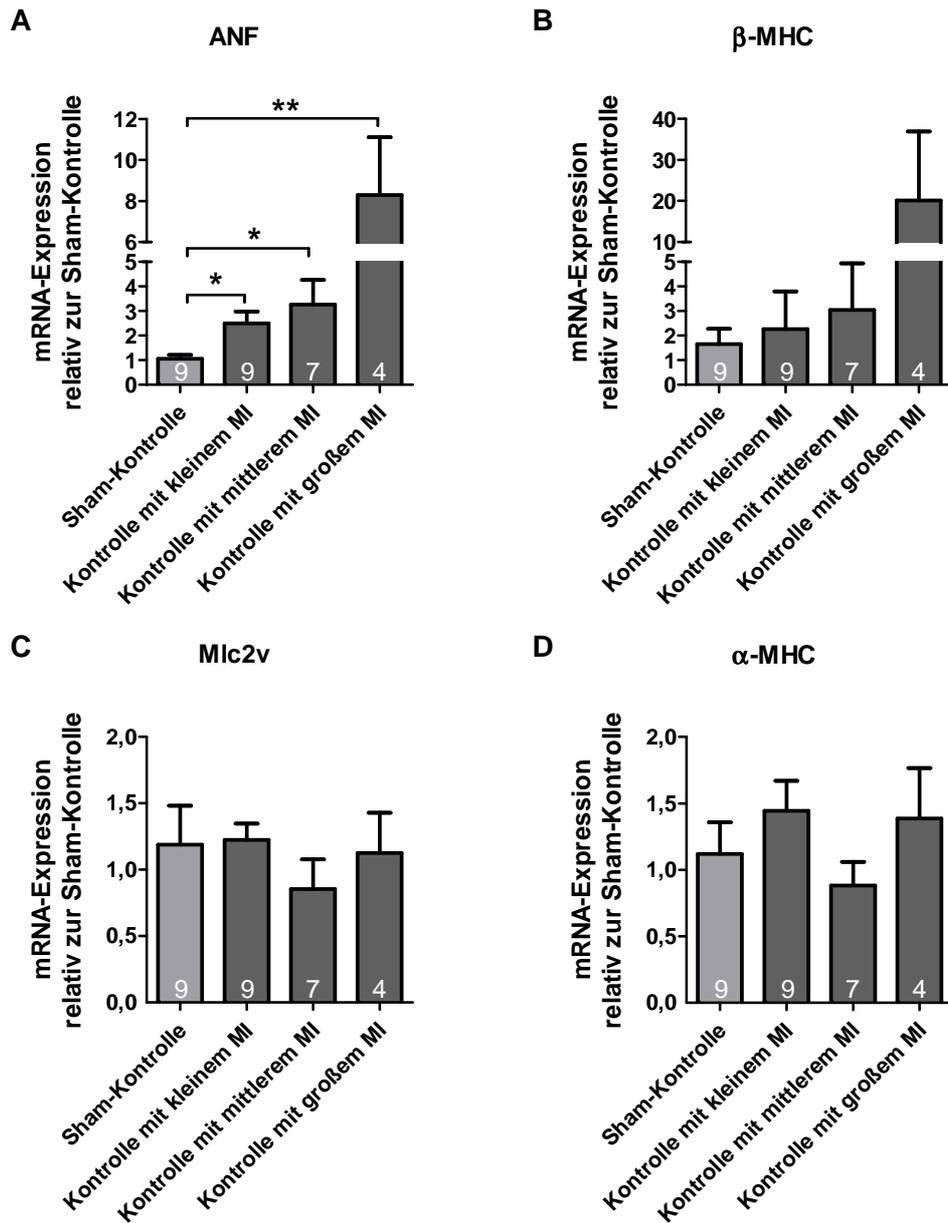
**Abb. 43: Induktion eines Myokardinfarktes resultiert in Abhängigkeit des physischen Aktivitätsstatus in unterschiedlich ausgeprägter Re-Expression fetaler Gene**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurden die Gene (A) ANF, (B)  $\beta$ -MHC, (C) MLC2V und (D)  $\alpha$ -MHC mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der einzelnen Gene wurde pro Behandlungsgruppe gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Sham-Kontrolle gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test). ANF=Atrialer Natriuretischer Faktor;  $\beta$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\beta$ ;  $\alpha$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\alpha$ ; MLC2V=Ventricular Myosin Light Chain Isoform 2; MI=Myokardinfarkt

Aus den in Abb. 43 demonstrierten Expressionsanalysen geht hervor, dass die infarktinduzierte Hypertrophie in den untrainierten Kontrolltieren von einer annähernd 4-fachen Transkriptionssteigerung des fetalen Gens ANF und tendenziell von einer etwa 3-fach gesteigerten  $\beta$ -MHC-Expression begleitet wurde. Die Re-Expression die-

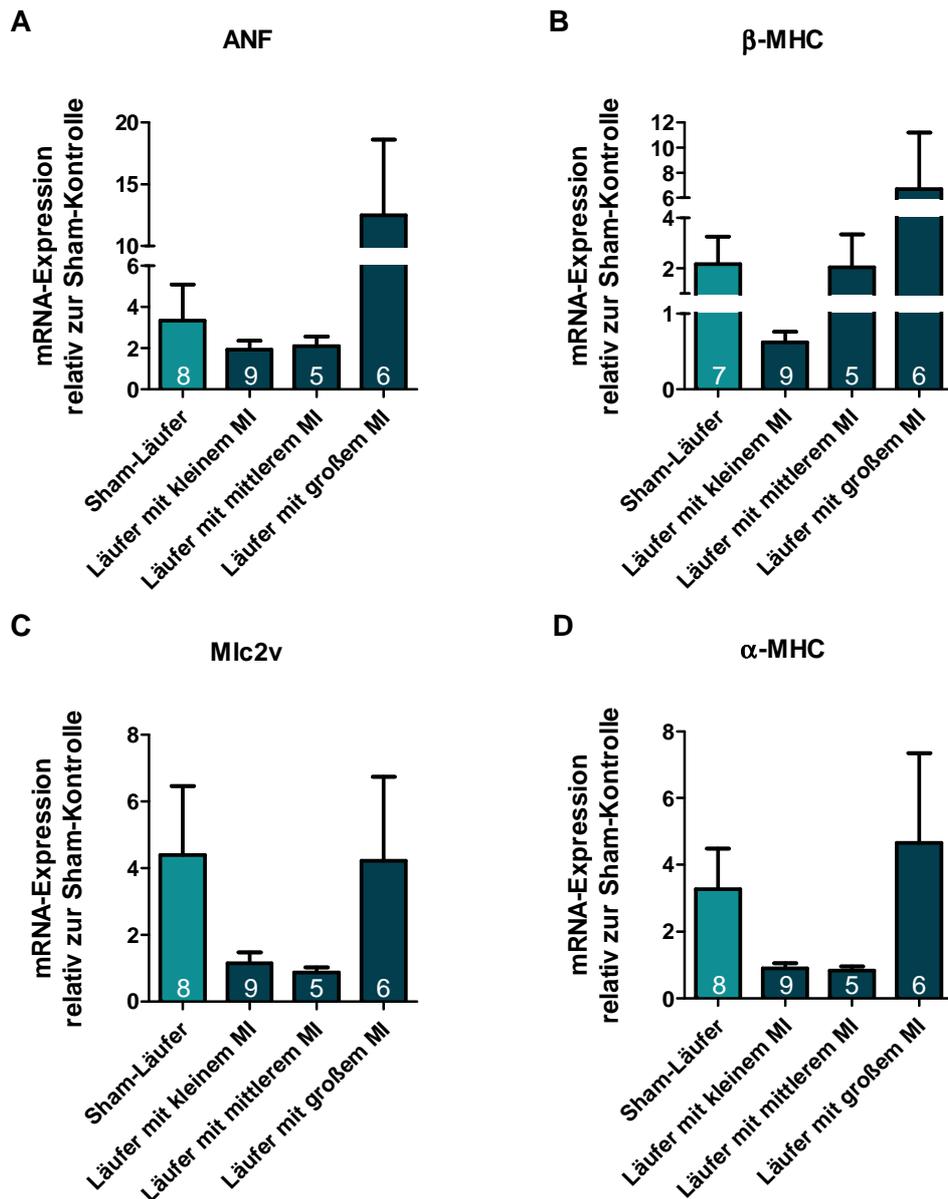
---

ser beiden Gene war in den MI-Läufern gegenüber ihrer Sham-Gruppe zwar tendenziell schwächer ausgeprägt, die breite Streuung der Einzelwerte ermöglichte jedoch keine definitive Aussage über eine vorliegende transkriptionelle Regulation. Der Expressionsstatus von MLC2V lieferte keinen Hinweis auf eine infarktinduzierte Reaktivierung des Gens. Die adulte MHC-Isoform  $\alpha$ -MHC unterlag einer tendenziellen Expressionszunahme in Abhängigkeit von körperlicher Aktivität, unabhängig von der Art der durchlaufenen Operation der Tiere. Die großen Abweichungen der Einzelwerte innerhalb der Infarkt-Gruppen in den Analysen der molekularen Hypertrophie-Marker waren Anlass dazu, die beiden Gruppen zu kategorisieren und die Expression der fetalen Gene für unterschiedliche Infarktgrößen zu betrachten. Die Einteilung der Infarkte in Kategorien erfolgte durch Auswertung Sirius Red gefärbter, unmittelbar unterhalb des Ligatur-Knotens herausgeschnittener, Gewebeschnitte. Die prozentualen Kollagenanteile des infarzierten Areals wurden in den beiden Infarktgruppen jeweils in Tertile eingeteilt. Hierbei wurde bei untrainierten Tieren ein prozentualer Fibrosegehalt von 15-40% in der Infarktzone als kleiner Infarkt, ein Gehalt von 41-55% als mittlerer und ein Kollagenanteil von 55-86% als großer Infarkt definiert. Für trainierte Mäuse ergaben sich aus der Berechnung folgende Tertile: 11-28%, 29-49% und 50-75%.



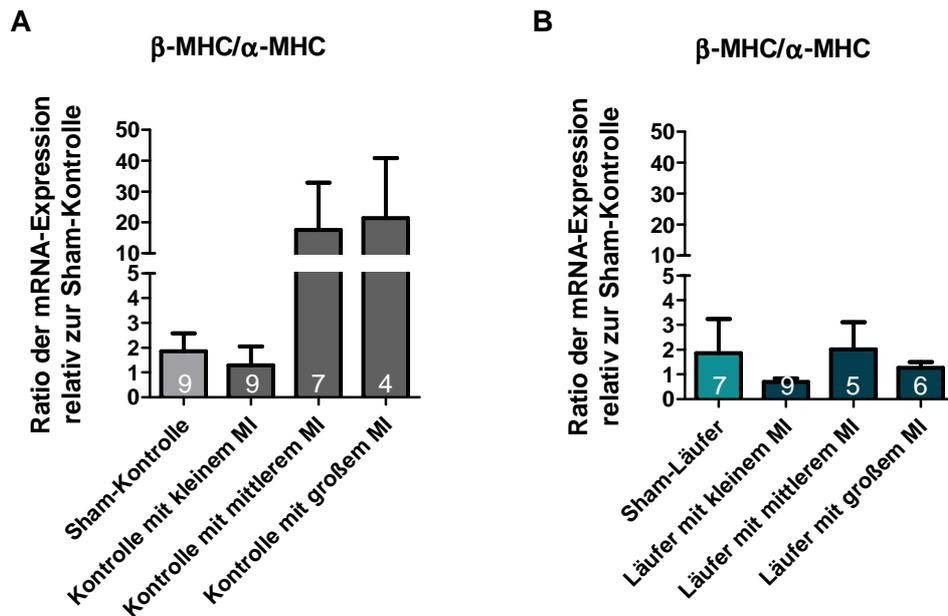
**Abb. 44: Das Ausmaß der Re-Expression fetaler Gene korreliert positiv mit der Infarktgröße in körperlich inaktiven Mäusen**

Die in Abb. 43 dargestellten Resultate quantitativer RT-PCR-Analysen der Gene (A) ANF, (B)  $\beta$ -MHC, (C) MLC2V und (D)  $\alpha$ -MHC LAD-ligierter, untrainierter, männlicher C57/Bl6N Mäuse (MI-Kontrollen), die in Relation zur Expression der Gene in den Sham-Kontrollen gesetzt worden waren, wurden in Gruppen mit kleinen, mittleren und großen Infarkten kategorisiert (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Ungepaarter T-Test). ANF=Atrialer Natriuretischer Faktor;  $\beta$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\beta$ ;  $\alpha$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\alpha$ ; MLC2V=Ventricular Myosin Light Chain Isoform 2; MI=Myokardinfarkt



**Abb. 45: Körperliche Aktivität schützt bei kleinen und mittelgroßen Infarkten vor Re-Expression des fetalen Genprogramms**

Die in Abb. 43 dargestellten Resultate quantitativer RT-PCR-Analysen der Gene (A) ANF, (B)  $\beta$ -MHC, (C) MLC2V und (D)  $\alpha$ -MHC LAD-ligierter, trainierter, männlicher C57/Bl6N Mäuse (MI-Läufer), die in Relation zur Expression der Gene in den Sham-Kontrollen gesetzt worden waren, wurden in Gruppen mit kleinen, mittleren und großen Infarkten kategorisiert (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt; Ungepaarter T-Test). ANF=Atrialer Natriuretischer Faktor;  $\beta$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\beta$ ;  $\alpha$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\alpha$ ; MLC2V=Ventricular Myosin Light Chain Isoform 2; MI=Myokardinfarkt



**Abb. 46: Körperliche Aktivität kehrt tendenziell das infarktinduzierte MHC-Expressionsverhältnis in Richtung der adulten Isoform um**

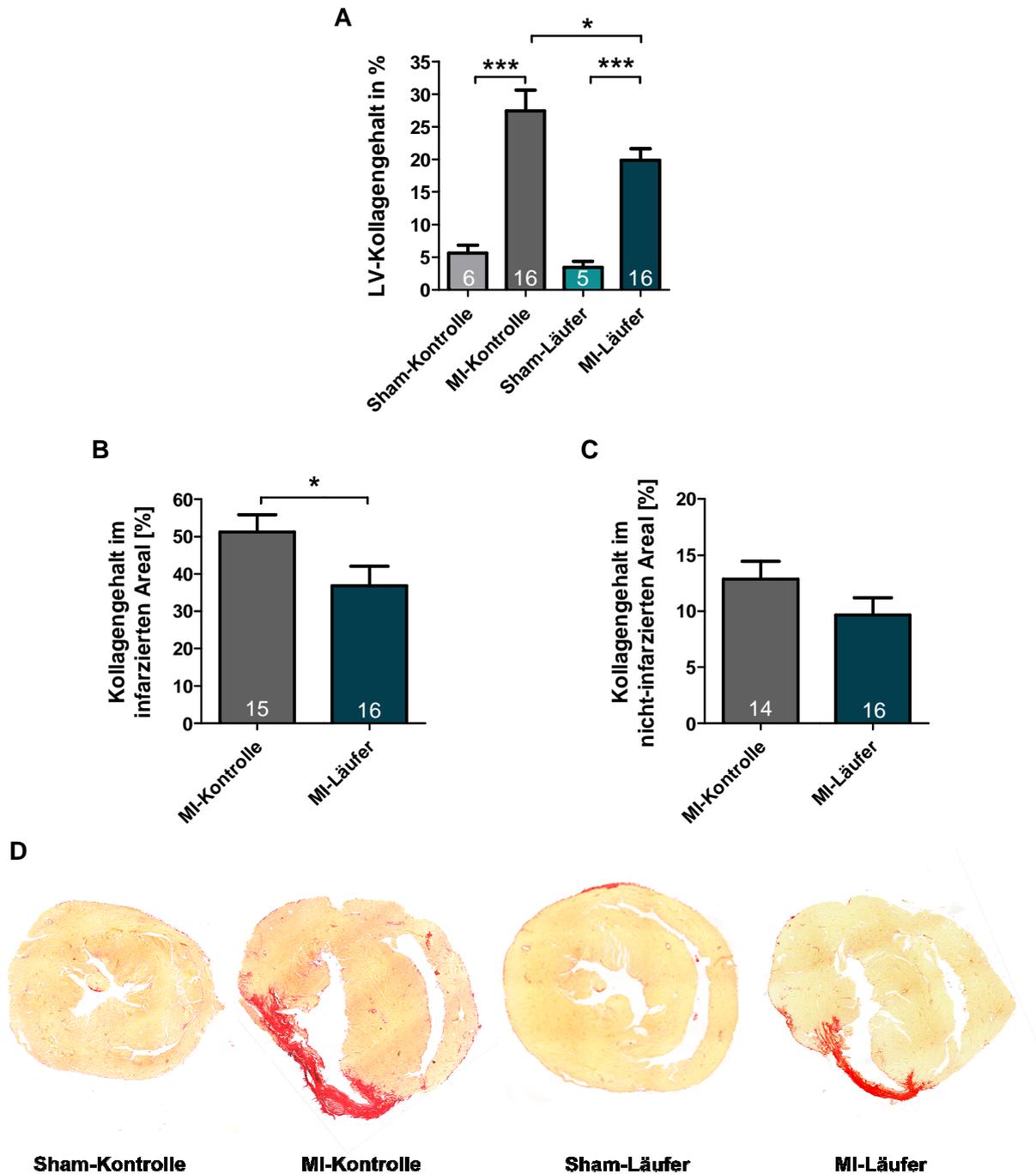
Aus den in Abb. 44 und Abb. 45 dargestellten Resultaten quantitativer RT-PCR-Analysen der Gene  $\beta$ -MHC und  $\alpha$ -MHC wurde das Expressionsverhältnis der beiden MHC-Isoformen in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen in Abhängigkeit von der Infarktgröße kalkuliert (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt; Ungepaarter T-Test).  $\beta$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform  $\beta$ ;  $\alpha$ -MHC=Myosin Heavy Chain Isoform, MI=Myokardinfarkt

Aus Abb. 44 und Abb. 45 geht hervor, dass die untersuchten fetalen Gene in körperlich aktiven und körperlich inaktiven Mäusen abhängig von deren Infarktgrößen auf unterschiedliche Weise transkriptionell reguliert wurden. So zeigte sich, dass der Expressionsstatus der fetalen Gene ANF und  $\beta$ -MHC in körperlich inaktiven Mäusen mit der Infarktgröße positiv korrelierte (Abb. 44). Bereits kleine Infarkte bewirkten eine signifikante Heraufregulation von ANF und eine tendenzielle Expressionszunahme von  $\beta$ -MHC. Betrachtet man die Gruppe der MI-Läufer (Abb. 45), so zeigt sich, dass ANF und  $\beta$ -MHC in Tieren mit kleinen und mittleren Infarkten zunächst gegenüber den Sham-operierten Läufern tendenziell herab reguliert wurden und lediglich in den Mäusen mit großen Infarkten das Basallevel der Sham-Tiere überschritten wurde. Zudem ist auffällig, dass die fetale MHC-Isoform eine 12-fache Transkriptionssteigerung in untrainierten Tieren mit großem Infarkt, eine 3-fache in trainierten Tieren im Vergleich zu deren Sham-Entsprechungen aufwies. Auch die MLC2V-Expression erfuhr in trainierten Infarkttieren zunächst eine Reduktion und erreichte nur in Tieren mit großem Vorderwandinfarkt das Niveau der Sham-Läufer. Diese Beobachtungen könnten somit auf einen Präventivmechanismus hinweisen, über den das Ausdauer-

training den Remodeling-Prozess, zumindest bei kleinen bis mittelgroßen Infarkten, via Transkriptionskontrolle fetaler Gene abschwächt. Die Hypothese, dass körperliche Aktivität kardioprotektive Wirkungen entfaltet wird dadurch gestützt, dass die Expression des adulten  $\alpha$ -MHC in Läufern mit großem Infarkt gesteigert wurde, eventuell als letzte Instanz um den  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC-Shift zu Gunsten der adulten Isoform zu verschieben. Das MHC-Expressionsverhältnis in körperlich inaktiven Mäusen verschob sich offensichtlich bei moderaten und großen Infarkten in Richtung der fetalen Isoform, verfehlte jedoch statistische Signifikanz (Abb. 46). Das Expressionsverhältnis in trainierten Tieren unterschied sich hingegen nicht von dem Sham-operierter Laufmäuse, unabhängig von der vorliegenden Infarktgröße (Abb. 46) und weist auf eine vorrangige Expression der adulten MHC-Isoform und somit auf positive Effekte von Ausdauertraining auf die kardiale Kontraktilität hin.

#### **4.3.3 Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf die kardiale Fibrose**

Der Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt ist neben der Kardiomyozyten-Hypertrophie von der Induktion der Fibrose, d. h. also einer anormal gesteigerten Kollagensynthese im Infarktareal und von einer Ausbreitung des infarzierten Bereiches gekennzeichnet. Um den Einfluss körperlicher Aktivität auf das linksventrikuläre Remodeling zu untersuchen, wurde der prozentuale linksventrikuläre Gesamtgehalt des Kollagens in allen Behandlungsgruppen bestimmt. Weiterhin erfolgte die prozentuale Ermittlung des Kollagenanteils im infarzierten und im nicht-infarzierten Areal in den beiden Infarktgruppen.

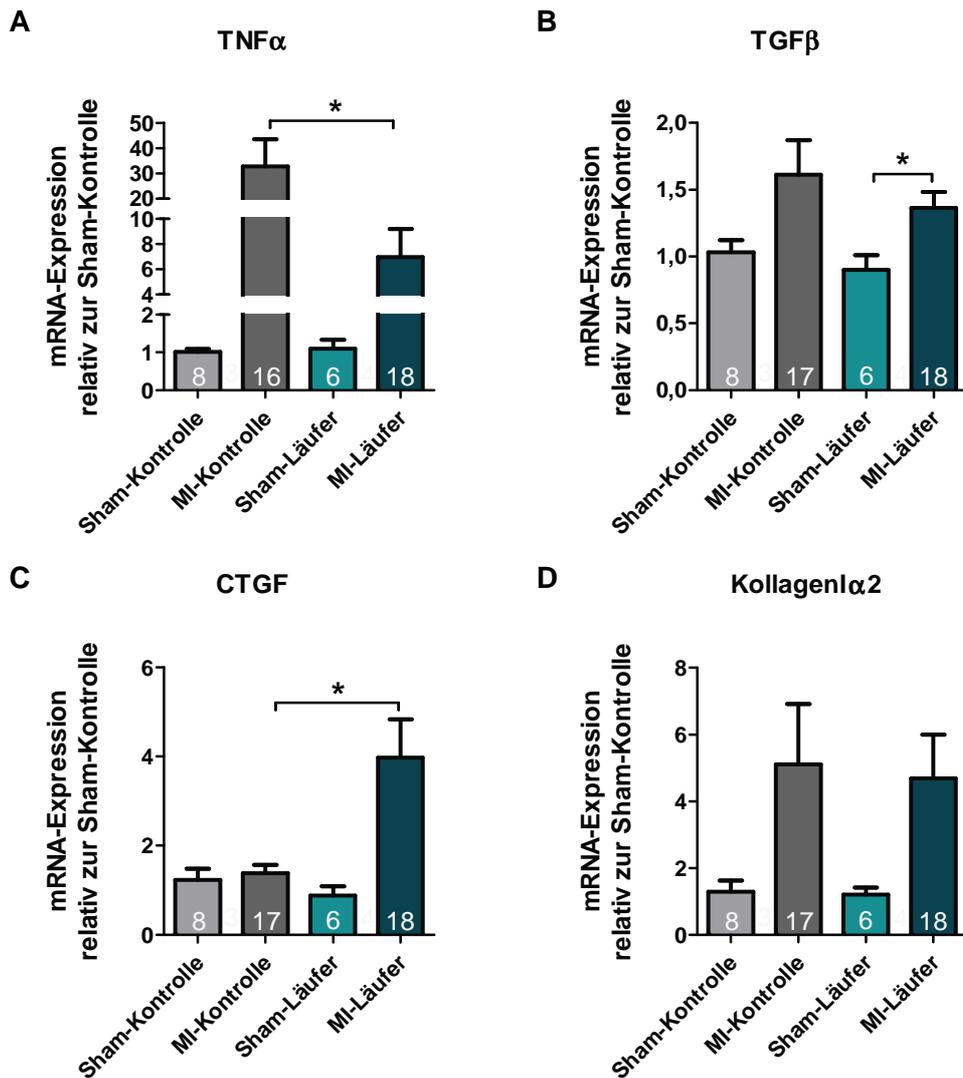


**Abb. 47: Ausdauersport vor und nach Myokardinfarkt reduziert den linksventrikulären Kollagengehalt und die Infarktgröße**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde in Sirius Red gefärbten mittventrikulären Gewebeschnitten der 4 Mausgruppen (A) der linksventrikuläre Kollagengehalt, in den Infarktieren der Fibroseanteil im (B) infarzierten und (C) im nicht-infarzierten Areal in 10-facher Vergrößerung in % bestimmt. (D) Exemplarische Übersichtsaufnahmen Sirius Red gefärbter mittventrikulärer Schnitte der 4 Behandlungsgruppen in 4-facher Vergrößerung. (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ; Ungepaarter T-Test) MI=Myokardinfarkt; LV=linksventrikulär

Die prozentuale Ermittlung des linksventrikulären Kollagengehalts ergab, dass die permanente LAD-Ligatur über 4 Wochen in einer Fibrosezunahme um  $18,83 \pm 4,34\%$  in MI-Kontrollen, um  $16,45 \pm 2,7\%$  in MI-Läufern gegenüber ihren Sham-Entsprechungen resultierte. Hierbei wiesen MI-Kontrollen einen linksventrikulären Kollagen-Gesamtanteil von  $27,46 \pm 3,17\%$ , MI-Läufer einen prozentualen Gehalt von  $19,87 \pm 1,77\%$  auf. Dieser Ausdauer-sport-abhängige Unterschied in der Ausprägung der maladaptiven Antwort wurde auch bei der Betrachtung des prozentualen Anteils fibrotischen Gewebes im infarzierten Areal evident. So provozierte der Vorderwandinfarkt in untrainierten Mäusen in der Infarktzone einen Fibroseanteil von durchschnittlich  $51,20 \pm 4,63\%$ , der sich signifikant von den  $36,89 \pm 5,12\%$  in trainierten Tieren unterschied. Weiterhin konnte in den Läufern ein tendenziell geringeres Ausmaß interstitieller Fibrose im nicht-infarzierten Areal nachgewiesen werden. Betrachtet man die exemplarischen Gewebeschnitte der beiden Infarktgruppen in Abb. 47, so wird deutlich, dass in untrainierten Versuchstieren das Infarktareal größer und folglich die Infarktexpansion, als Ereignis der frühen Remodeling-Phase, stärker ausgeprägt war als in physisch aktiven Tieren. Somit scheint die Konklusion zulässig, dass Ausdauertraining im Vorfeld und nach abgelaufenem Infarkt einen günstigen Effekt auf die Fibrosierung und somit auf den progressiven Remodeling-Prozess ausüben könnte.

Zur näheren Betrachtung der Ausdauer-sport-bedingten Effekte auf den Fibroseprozess nach Myokardinfarkt wurden nachfolgend die Gen-Expressionsmuster der profibrotischen Faktoren TGF $\beta$  und CTGF, des Kollagens  $\alpha 2$ , dessen Gehalt in der extrazellulären Matrix den Steifheitsgrad des Ventrikels determiniert, und des inflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  untersucht.



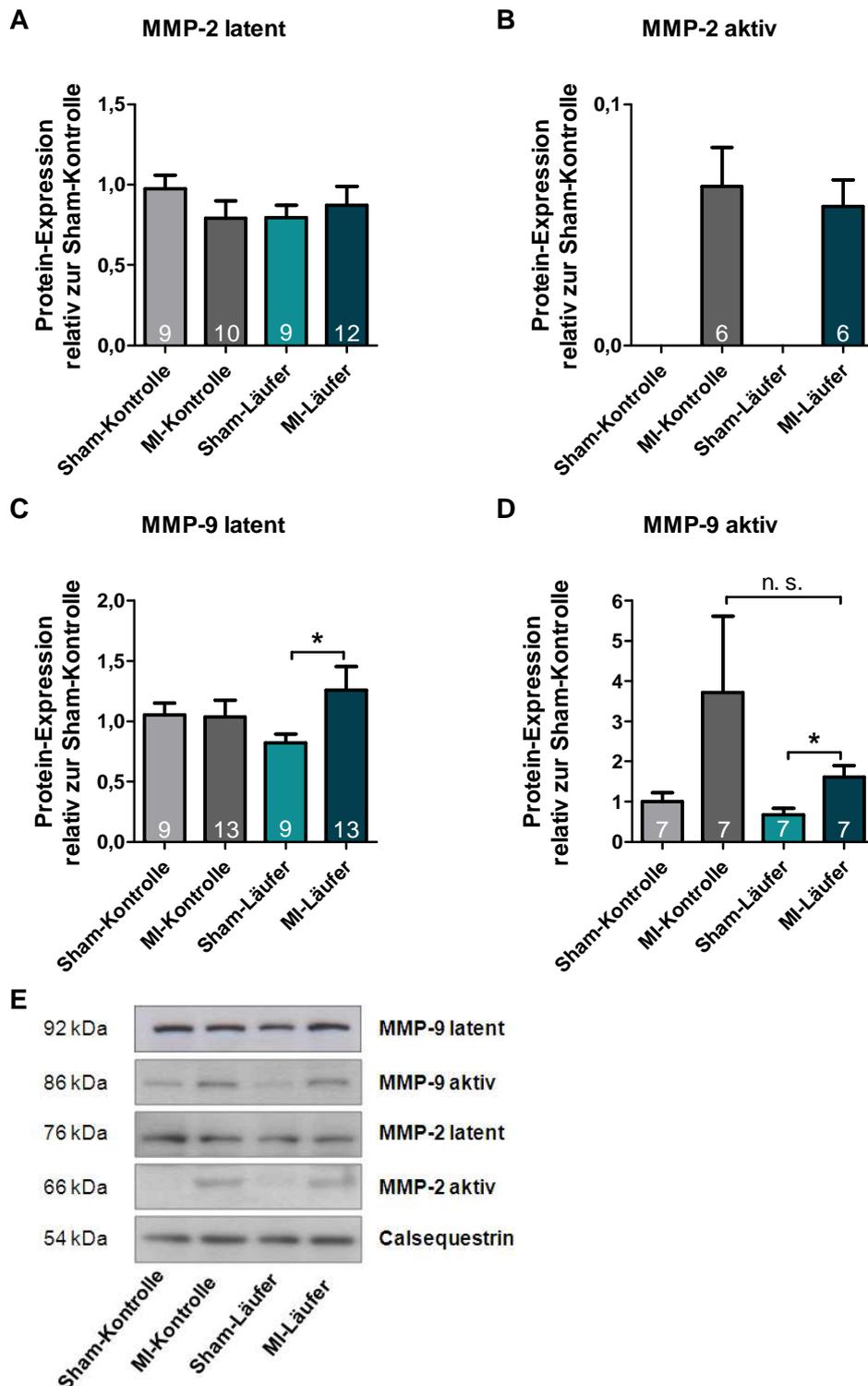
**Abb. 48: Induktion eines Myokardinfarktes modifiziert abhängig vom Aktivitätsstatus behandelter Tiere die mRNA-Expression pro-fibrotischer Gene auf unterschiedlich Weise**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurden die pro-fibrotischen Gene (A) TNF $\alpha$ , (B) TGF $\beta$ , (C) CTGF und (D) Kollagen I $\alpha$ 2 mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der einzelnen Gene wurde pro Behandlungsgruppe gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Sham-Kontrolle gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test). TNF $\alpha$ =Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ; TGF $\beta$ =Transforming Growth Factor  $\beta$ ; CTGF= Connective Tissue Growth Factor

Die Expressionsanalysen pro-fibrotischer Gene ergaben, dass ein anterolateraler Vorderwandinfarkt in untrainierten Mäusen, verglichen mit den Sham-operierten Kontrollen, zu einer 32-fachen Transkriptionssteigerung des Zytokins TNF $\alpha$  führte. Diese Heraufregulation des Gens wurde in körperlich aktiven Mäusen nach permanenter LAD-Ligatur 5- bis 6-fach abgemildert (Abb. 48 A). TGF $\beta$  erfuhr, verglichen mit den jeweiligen Sham-Tieren, eine vergleichsweise schwache Heraufregulation in beiden

Infarktgruppen, unabhängig vom Trainingszustand der Tiere. Der pro-fibrotische Faktor CTGF wurde interessanterweise nur in der MI-Laufgruppe deutlich herauf reguliert und unterlag keiner Regulation in den untrainierten Infarkttieren. Das Kollagen  $\alpha 2$ -codierende Gen unterlag einer tendenziellen Transkriptionssteigerung in beiden Infarktgruppen jeweils um das 4-fache des Sham-Levels.

Da die Gefüge-Dilatation des linken Ventrikels und die Versteifung linksventrikulärer Wände nach Myokardinfarkt das Resultat einer Kombination von Kardiomyozyten-Hypertrophie, Fibrose und Aktivierung der MMPs darstellt, wurde nachfolgend Expressionsstatus und Aktivierungszustand der Gelatinasen MMP-2 und -9 in den Behandlungsgruppen analysiert.



**Abb. 49: Induktion eines Myokardinfarktes führt in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen zur Aktivierung der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9**

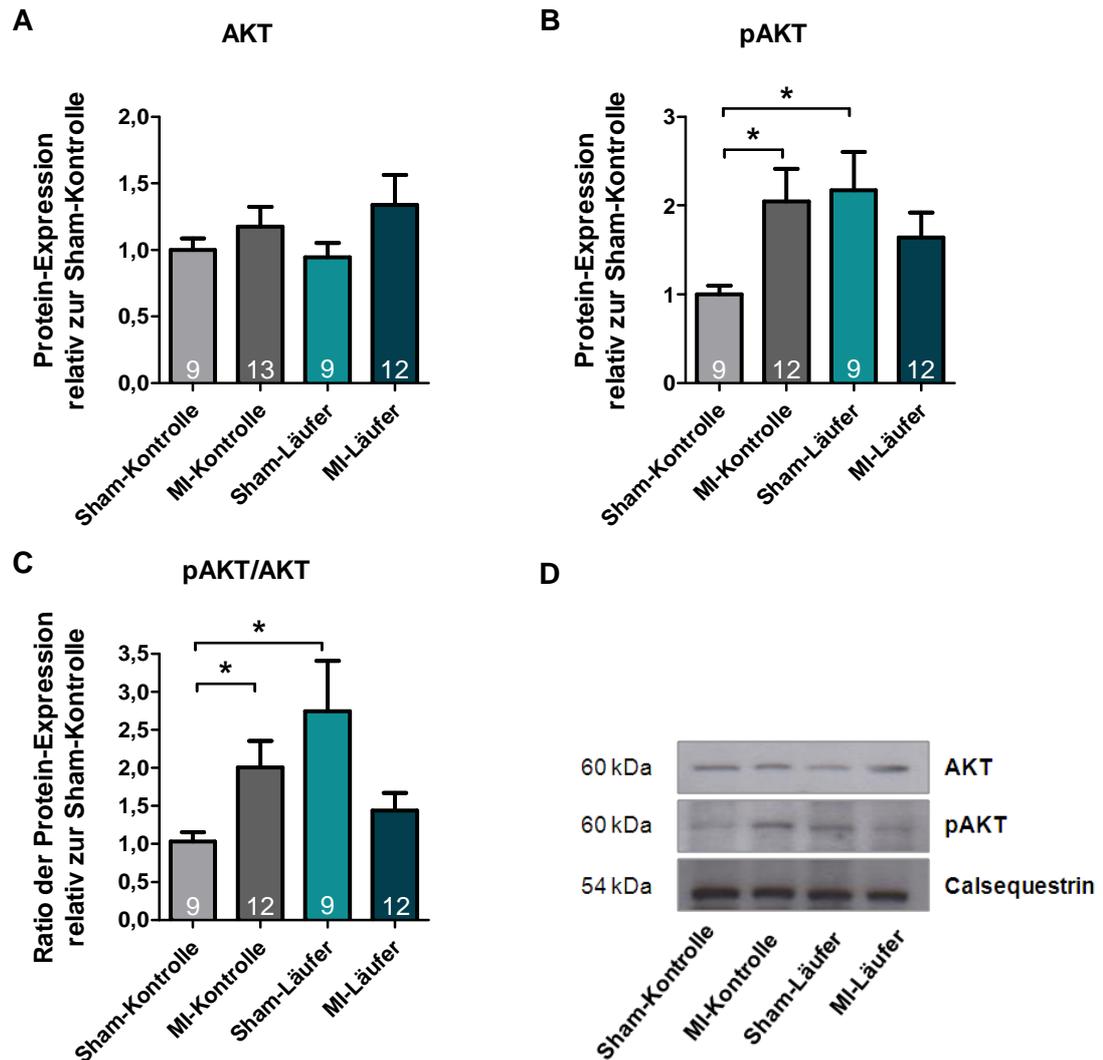
Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen) C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-OP (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde (A) die Expression der latenten und aktiven Isoformen der MMP-2 (A, B) und der MMP-9 (C, D) im Western-Blot detektiert, gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. (E) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3-4 Western-Blots densitrometriert. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) MMP=Matrixmetalloproteinase, MI=Myokardinfarkt

Aus Abb. 49 geht hervor, dass der Expressionsstatus der latenten MMP-2 keinem Einfluss durch das Vorliegen eines Myokardinfarktes oder durch körperliches Training unterlag. Im Gegensatz dazu führte das maladaptive Ereignis, unabhängig vom Aktivitätszustand der untersuchten Mäuse, zu einer deutlichen Expression der aktiven Gelatinase, welche in keiner der beiden Sham-Gruppen detektiert werden konnte. Latente und aktive Isoformen der MMP-9 erfuhren eine schwache Expressionssteigerung in trainierten Infarkttieren. Der Myokardinfarkt zog in körperlich inaktiven Mäusen tendenziell eine deutlichere Aktivierung dieser Metalloproteinase nach sich.

Zusammengefasst zeigen die in diesem Kapitel aufgeführten Analysen, dass eine 4-wöchige permanente LAD-Ligatur sowohl in untrainierten Kontrolltieren, als auch in Mäusen, die vor und nach dem operativen Eingriff körperlich aktiv waren, zur Induktion einer Hypertrophie führte. Obwohl sich das Ausmaß der LV-Hypertrophie 4 Wochen nach Myokardinfarkt zwischen trainierten und untrainierten Mäusen nicht unterschied, so deuten dennoch mehrere Parameter darauf hin, dass es sich bei trainierten Mäusen um eine eher adaptive Hypertrophie handelt, während untrainierte Mäuse die deutliche Signatur maladaptiven Remodelings aufweisen.

#### **4.3.4 Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach Myokardinfarkt auf Komponenten der PI3K- und der MAPK-Kaskade**

Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob kardioprotektive Effekte des Ausdauersports die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs, der die adaptive Form der Hypertrophie induziert, involvieren. Als Komponenten der Signalkaskade sollten die kardioprotektive Kinase AKT und die von dieser aktivierten Translations-initiierende P70S6-Kinase untersucht werden. Des Weiteren sollte der Expressions- und Aktivierungsstatus der GSK3 $\beta$ , welche als negativer Regulator der maladaptiven Hypertrophie gilt, in Abhängigkeit körperlicher Aktivität im Infarktmodell determiniert werden. Schließlich sollte eine regulatorische Rolle der MAP-Kinase ERK42/44, über deren Beteiligung an der Induktion der adaptiven Hypertrophie spekuliert wird, im Modell geprüft werden.

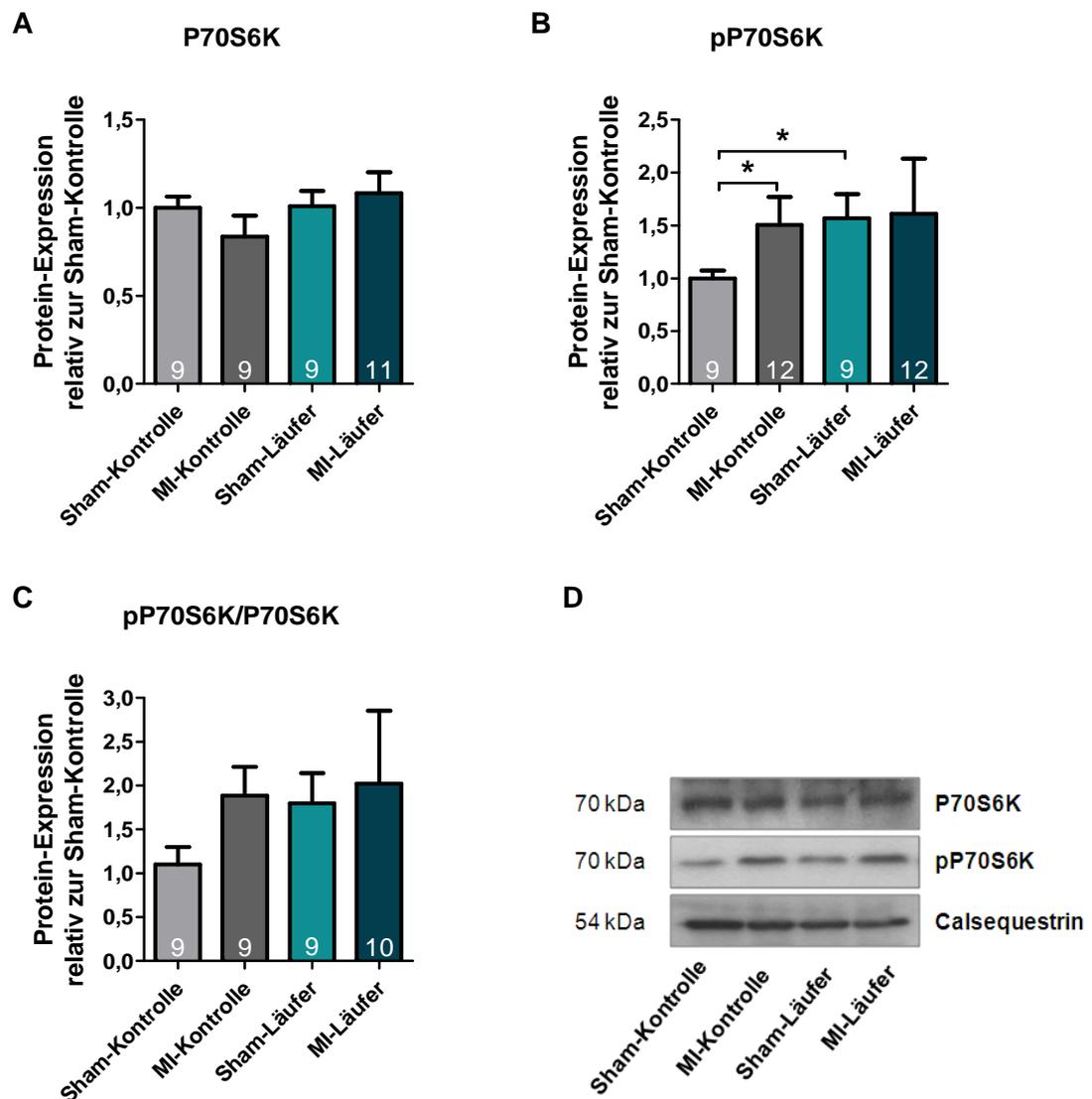


**Abb. 50: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Aktivierung von AKT**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde (A) die Gesamtexpression der Kinase AKT, sowie (B) deren Aktivitätsstatus im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. Zusätzlich wurde (C) die Gesamtexpression zu der Expression der aktiven Kinase in Relation gesetzt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 4 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) AKT=Proteinkinase B, MI=Myokardinfarkt

Die dargestellte Expressionsanalysen der Proteinkinase AKT zeigen, dass deren Gesamtexpression keiner eindeutigen Regulation durch Induktion pathologischer (MI-Kontrolle) oder physiologischer Hypertrophie (Sham-Läufer) unterlag. Beide Hypertrophie-Arten, denen bekanntlich eine AKT-abhängige Induktion zu Grunde liegt, provozierten per se, wie erwartet, eine Expressionszunahme der aktiven Isoform. Diese Effekte wurden ebenfalls bei Betrachtung des Verhältnisses zwischen Ge-

samtexpression und post-translational modifiziertem Protein deutlich. Eine Kombination aus den beiden Hypertrophie-Varianten in den MI-Läufern schien Expression und Aktivierung der Kinase in gleichem Maße zu induzieren und bewirkte somit keine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der aktiven Isoform. Es lagen jedoch keine eindeutigen Hinweise auf eine divergente Regulation der untersuchten Kinase in körperlich aktiven und inaktiven Infarkttieren vor.



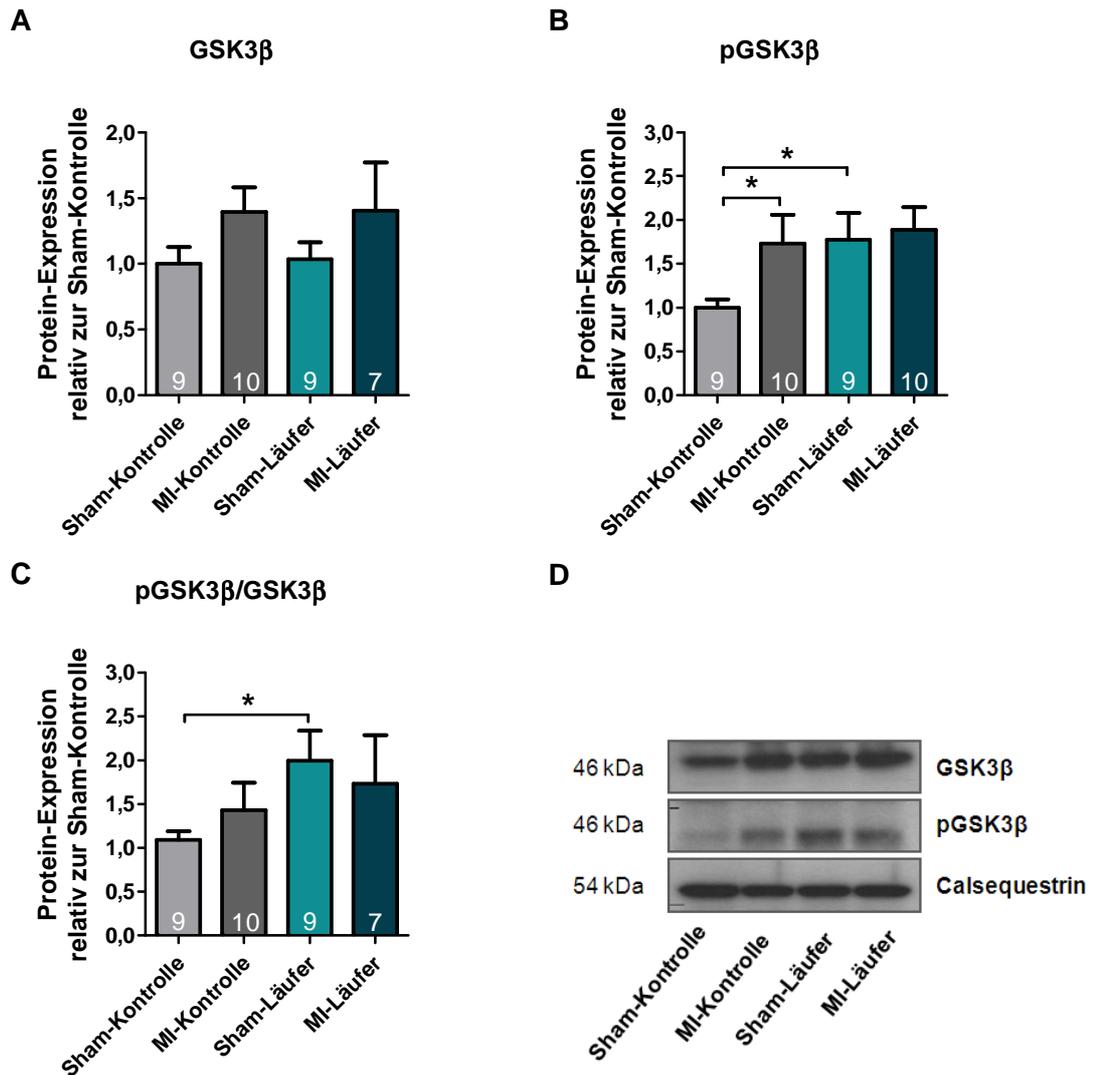
**Abb. 51: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Aktivierung der P70S6K**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde (A) die Gesamtexpression der Kinase P70S6K, sowie (B) deren Aktivitätsstatus im Western-Blot detektiert, gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. Zusätzlich wurde (C) die Gesamtexpression zu der Expression der aktiven Kinase in Relation gesetzt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 4 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) P70S6K= Ribosomale Proteinkinase P70S6, MI=Myokardinfarkt

---

Die in Abb. 51 dargestellten Expressionsmuster der P70S6-Kinase, dem downstream Target der Kinase AKT, spiegeln deren Modulation in Abhängigkeit der unterschiedlichen Behandlungen wider (siehe Abb. 50). So unterlag die Gesamtexpression der ribosomalen Kinase keiner Regulation durch die Induktion hypertropher Antworten, wurde jedoch gegenüber den Kontrollen durch den pathologischen (MI-Kontrollen) und den physiologischen (Sham-Läufer) Stimulus aktiviert. Der Vorderwandinfarkt hatte keinen additiven Einfluss auf die Sport-induzierte Aktivitätszunahme der Kinase. Weiterhin lagen keine Unterschiede in Expressions-/Aktivierungslevel zwischen trainierten und untrainierten Infarkttieren vor.

Im Gegensatz zu den untersuchten pro-hypertrophen Komponenten des PI3-Kinase Signalwegs, zählt die GSK3 $\beta$  zu den wenigen bisher identifizierten Kinasen, deren aktivierte Isoform die Hypertrophie negativ reguliert. Die Expression der aktiven und der phosphorylierten, inaktiven Isoform der Kinase wurde im weiteren Versuchsverlauf untersucht.



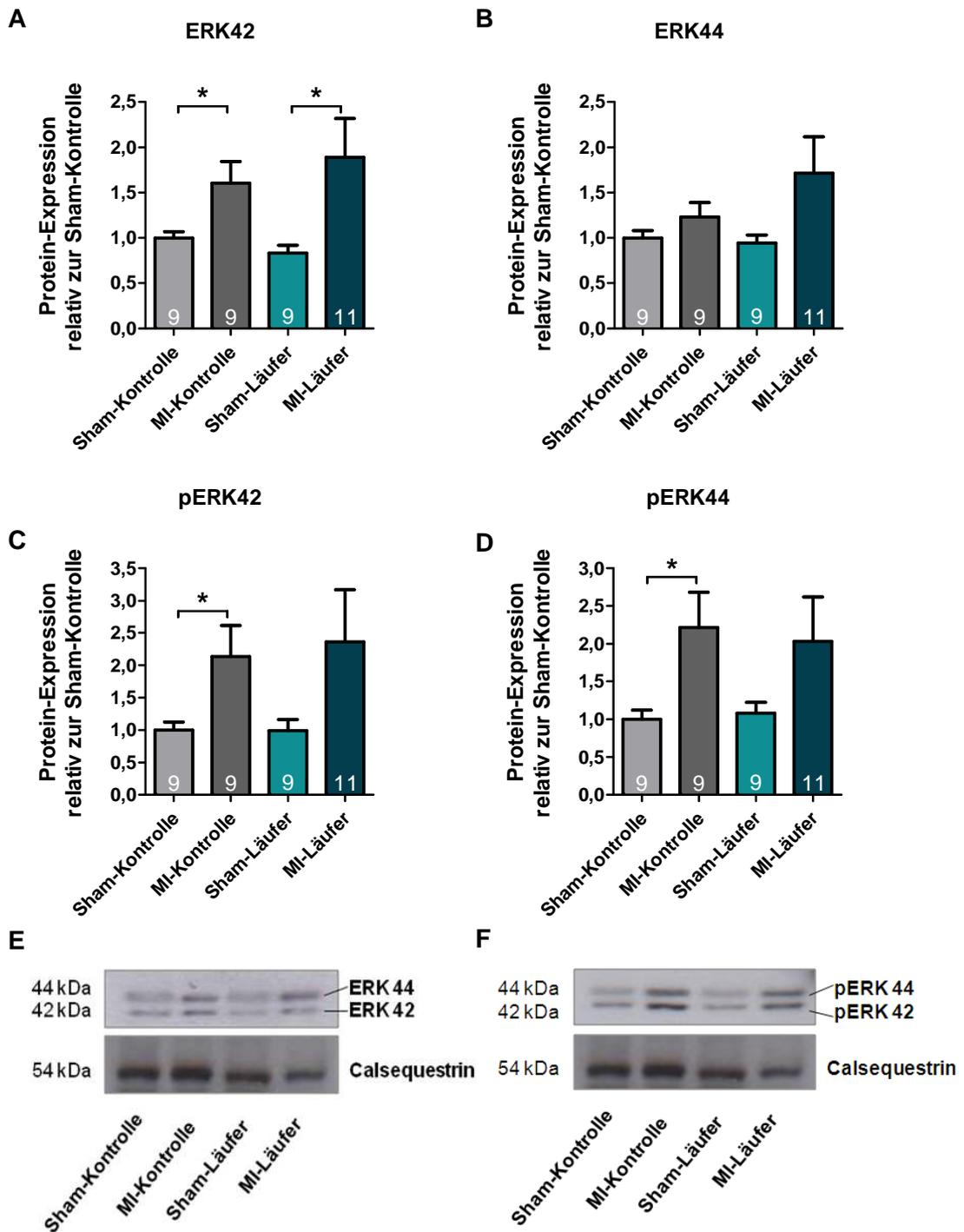
**Abb. 52: Induktion pathologischer und physiologischer Hypertrophie führt zur Inaktivierung der GSK3β**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde (A) die Gesamtexpression der Kinase GSK3β, sowie (B) deren Aktivitätsstatus im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. Zusätzlich wurde (C) die Gesamtexpression zu der Expression der aktiven Kinase in Relation gesetzt. (D) Exemplarischer Western-Blot. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) GSK3β=Glycogensynthasekinase 3 β, MI=Myokardinfarkt

Wie in Abb. 52 gezeigt, unterlag die GSK3β tendenziell einer Expressionszunahme in Abhängigkeit eines Vorderwandinfarktes in körperlich aktiven und inaktiven Versuchstieren. Konsistent mit der durch physiologische und pathologische Stimulation initiierten Aktivierung der AKT und der P70S6K, welche die Inhibierung der GSK3β vermitteln, bewirkte die Induktion beider Hypertrophie-Varianten gegenüber der Sham-Kontrolle eine deutlich vermehrte Phosphorylierung, d. h. Inaktivierung der hier

untersuchten Kinase. Durch den physiologischen Stimulus induzierte Inaktivierung der GSK3 $\beta$  wurde nicht durch gleichzeitiges Vorliegen des Myokardinfarktes potenziert. Das Expressionsverhältnis der Kinase wurde in den physiologisch hypertrophierten Mäusen deutlich in Richtung der inaktiven Isoform verschoben. Dieser Trend spiegelte sich in den Infarktgruppen wider.

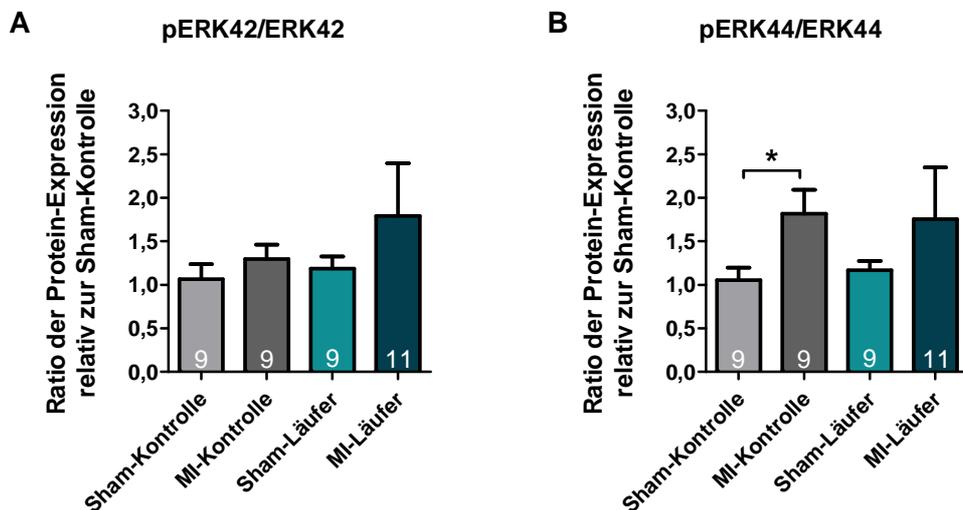
Als weiterer Effektor der hypertrophen Signaltransduktion sollte nun die Expression und Aktivität der MAP-Kinase ERK42/44 untersucht werden.



**Abb. 53: Gesamtexpression und Aktivitätsstatus der ERK42/44 unterliegen weitgehend unabhängig vom physischen Aktivitätsstatus der Versuchstiere einer Heraufregulation durch Induktion eines Myokardinfarktes**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde die Gesamtexpression der beiden ERK-Isoformen (A) ERK42 und (B) ERK44, sowie deren Aktivitätsstatus (C, D) im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. (E, F) Repräsentative Western-Blots. (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 3 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) MI=Myokardinfarkt

Wie aus Abb. 53 ersichtlich, unterlag die Gesamtexpression der Kinase ERK42 einer infarktabhängigen Heraufregulation in untrainierten und trainierten Mäusen. Diese Regulation spiegelte sich tendenziell bezüglich der 44 kDa großen Isoform ERK44 wider. Der Phosphorylierungsgrad und folglich der Aktivitätsstatus war im Falle beider Isoformen in den Infarkt-Kontrollen deutlich, in den Infarkt-Läufern lediglich tendenziell erhöht. Zwischen den beiden Infarktgruppen lagen keine evidenten Expressionsunterschiede vor. Um den Einfluss des maladaptiven kardialen Ereignisses bzw. des Ausdauersports auf die Rekrutierung der untersuchten Kinasen eingehender zu betrachten, wurde erneut die jeweilige Gesamtexpression zu der Expression des phosphorylierten Proteins ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse dieser Kalkulation sind in Abb. 54 dargestellt.



**Abb. 54: Induktion eines Myokardinfarktes verschiebt das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver ERK44 in Richtung der aktiven Isoform**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde die Gesamtexpression der beiden ERK-Isoformen (A) ERK42 und (B) ERK44, sowie deren Aktivitätsstatus im Western-Blot detektiert, gegen Expression des Referenzproteins Calsequestrin normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. Die Gesamtexpression wurde jeweils zu der Expression der aktiven Kinase in Relation gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test). MI=Myokardinfarkt

Die in obiger Abbildung gezeigten Berechnungen demonstrieren, dass sich die Relation zwischen Gesamtexpression und Expression der phosphorylierten Isoform ERK42 innerhalb der beiden Kontrollgruppen nicht signifikant unterschied. Dies deutet darauf hin, dass nicht der Pool an inaktiver ERK42 durch die permanente LAD-

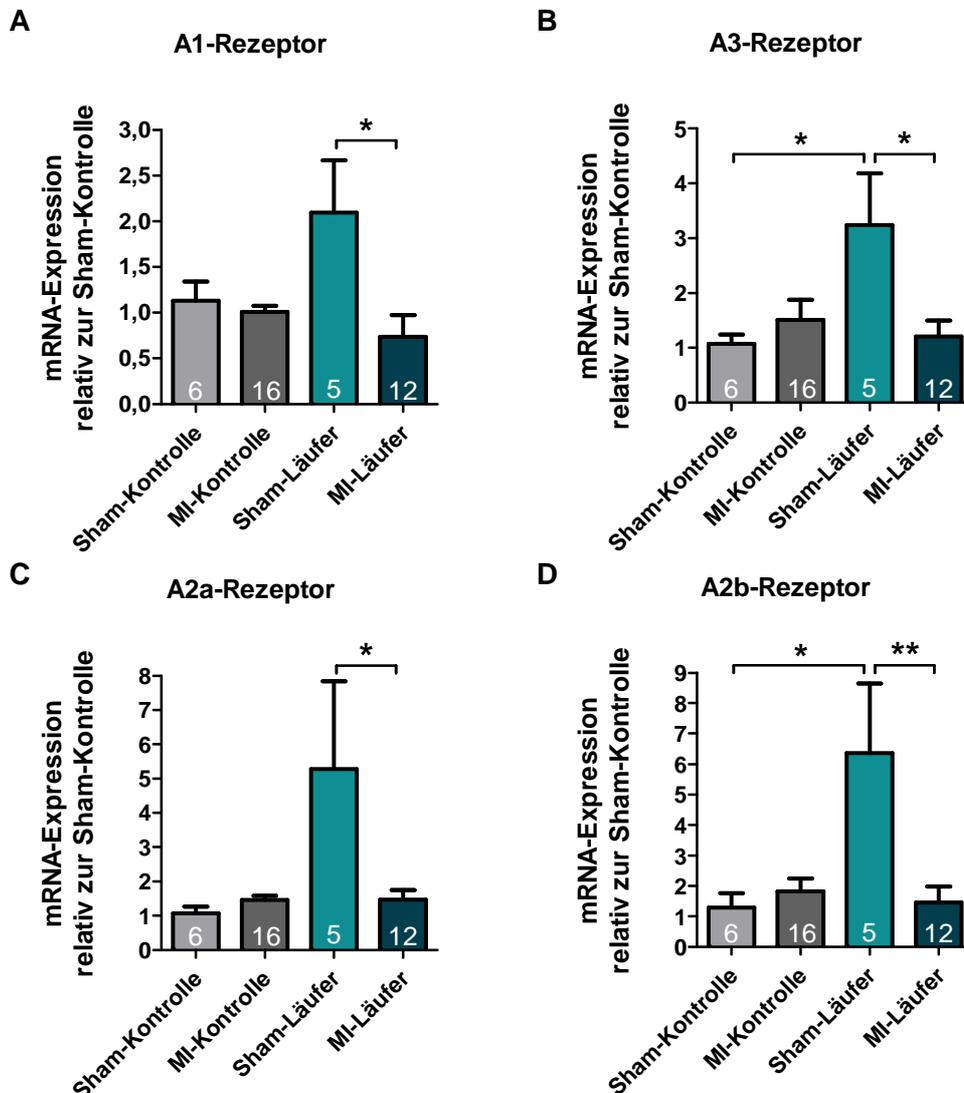
Ligatur gesteigert wurde, sondern vielmehr die infarktbedingt vermehrt exprimierte, inaktive ERK42 phosphoryliert wurde und somit als Effektor im induzierten Signalweg wirksam werden konnte. In den MI-Läufern zeigte sich eine tendenzielle Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der phosphorylierten ERK42, die großen Streuungen innerhalb der Gruppe lassen jedoch keine eindeutige Aussage über eine vorhandene Regulation zu. Bezüglich der ERK44 konnte im Falle der untrainierten Mäuse in Folge des Vorderwandinfarktes eine deutliche Verschiebung des Expressionsverhältnisses in Richtung der aktiven Form nachgewiesen werden. Dieser Trend zeigte sich auch im Vergleich zwischen Sham-Läufern und MI-Läufern. Dies deutet darauf hin, dass die ERK nicht unbedingt infarktbedingt vermehrt exprimiert wurde, sondern, dass bereits intrazellulär vorhandene Proteine post-translational modifiziert und somit aktiviert wurden. Weder Expression, noch Phosphorylierungsstatus der beiden ERK-Isoformen unterlagen nach Myokardinfarkt einer differentiellen Regulation in Abhängigkeit von physischer Aktivität. Da Expression und Aktivierungszustand der beiden ERK-Isoformen keiner Modulation in den physiologisch hypertrophierten Sham-Läufer unterlag, konnte eine Beteiligung der Kinase an der Induktion der physiologischen Hypertrophie nicht bestätigt werden.

Zusammengefasst zeigen die in diesem Kapitel dargestellten Expressionsanalysen, dass sowohl die ausdauersportinduzierte, als auch die infarktvermittelte hypertrophe Signaltransduktion die Aktivierung der AKT und der P70S6K, als Komponenten des PI3K-Signalwegs, involvieren. Die Entstehung beider Hypertrophie-Varianten scheint, wie erwartet, eine Inaktivierung der anti-hypertrophen GSK3 $\beta$  vorauszusetzen. Die Kinase ERK42/44 unterlag nur einer positiven Regulation durch den maladaptiven Stimulus, unabhängig vom Aktivitätszustand der Versuchstiere. Die Analysen lieferten keine evidenten Hinweise auf divergierende Signaltransduktionen zur Induktion der pathologischen Hypertrophie in physisch aktiven und physisch inaktiven Mäusen.

#### **4.3.5 Effekte körperlicher Aktivität im Vorfeld und nach induziertem anterolateralem Myokardinfarkt auf die Expression des Adenosinrezeptor-Systems**

Es wurde mittlerweile gezeigt, dass Adenosinkonzentrationen sowohl in akuten und chronischen Phasen nach Myokardinfarkt, als auch nach Ausdauertraining im Herzen erhöht sind. Um nun die Hypothese zu testen, dass eine ausdauersportbedingte Kar-

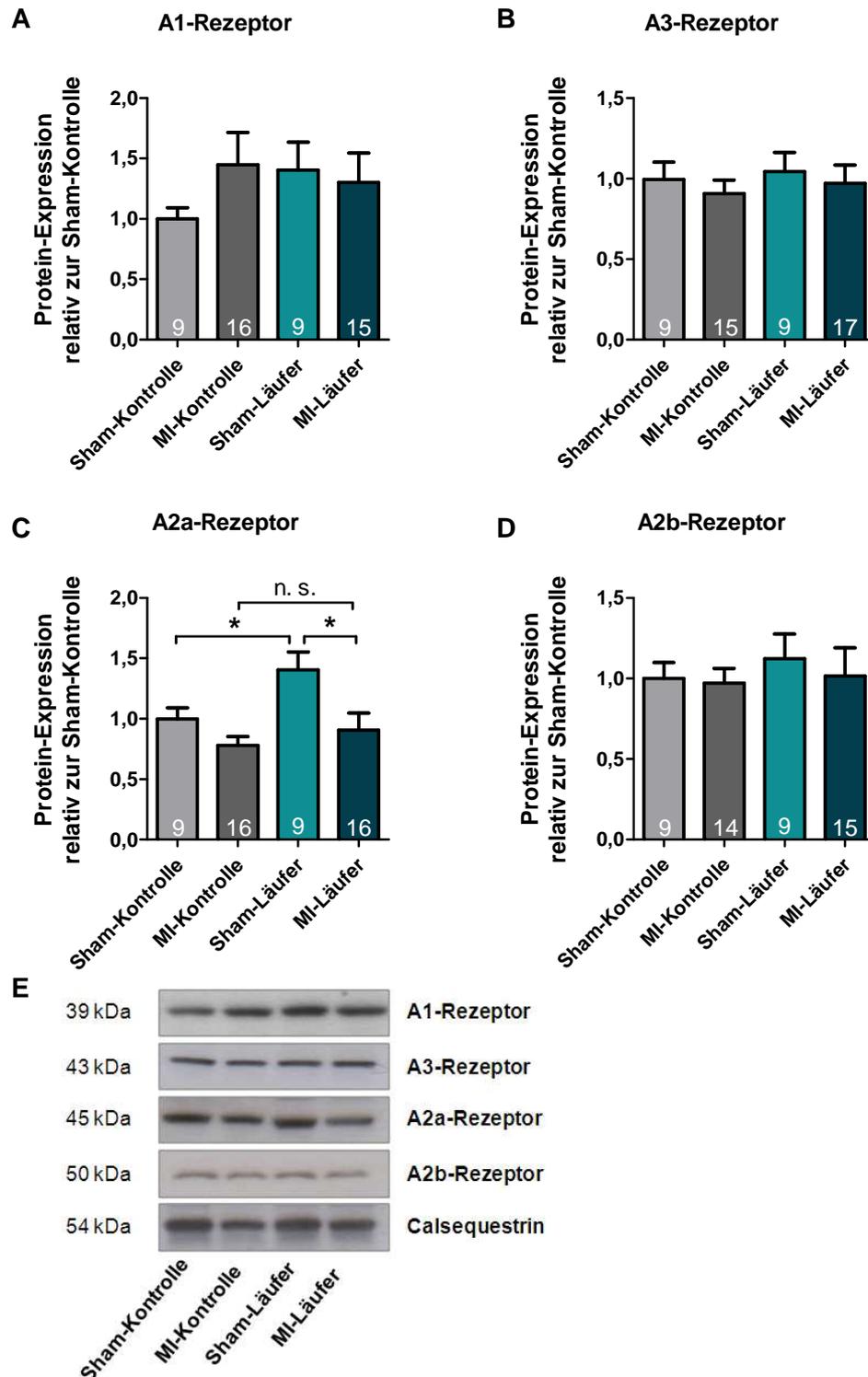
dioprotektion auch mit einer Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems assoziiert ist, wurde zunächst der mRNA-Expressionsstatus der 4 Adenosinrezeptor-Subtypen A1, A2a, A2b und A3 nach permanenter LAD-Ligatur in körperlich aktiven und körperlich inaktiven Mäusen determiniert.



**Abb. 55: Das Adenosinrezeptor-System unterliegt auf mRNA-Ebene einer Heraufregulation durch Ausdauertraining**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen), männliche C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurden die (A) A1-, (B) A3-, (C) A2a- und (D) A2b-Rezeptor codierenden Gene mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der einzelnen Gene wurde pro Behandlungsgruppe gegen die Expression des Referenzgens Gapdh normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in der Sham-Kontrolle gesetzt (Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Balken angegebenen Anzahl untersuchter Versuchstiere dargestellt, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Ungepaarter T-Test). MI=Myokardinfarkt

Die mRNA-Expressionsanalysen in Abb. 55 zeigen, dass alle Adenosinrezeptor-Subtypen in den Sham-operierten Läufern im Gruppenvergleich den höchsten Expressionslevel aufwiesen. Der Myokardinfarkt führte in körperlich aktiven Mäusen zur deutlichen Herabregulation aller Adenosin-Rezeptoren. Wie bei Betrachtung der beiden physisch inaktiven Mausgruppen ersichtlich, übte eine permanente LAD-Ligatur per se keinen regulatorischen Effekt auf den Transkriptionsstatus der Adenosinrezeptoren aus. Zur näheren Betrachtung des Adenosin-Systems erfolgte anschließend die Expressionsanalyse der Rezeptoren auf Protein-Ebene.



**Abb. 56: Der Adenosin-A2a-Rezeptor unterliegt einer Heraufregulation durch Ausdauertraining**

Trainierte (Läufer) und untrainierte (Kontrollen) C57/Bl6N Mäuse wurden nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI) bzw. nach Sham-Operation (Sham) weiterhin unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten. Nach 4 Wochen wurde die Expression der Adenosinrezeptoren (A) A1, (B) A3, (C) A2a und (D) A2b mittels Western-Blot detektiert, jeweils gegen die Calsequestrin-Expression normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. (E) Exemplarischer Western-Blot (Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus den Untersuchungen an n Versuchstieren (siehe Zahlen in den Balken). Es wurden je 4 Western-Blots densitrometrisch vermessen. \* $p < 0,05$ ; Ungepaarter T-Test) MI=Myokardinfarkt

Im Gegensatz zu den in Abb. 55 dargestellten Ergebnissen quantitativer PCR-Analysen, ergaben die durchgeführten Western-Blot Untersuchungen lediglich im Falle des Adenosin-A2a-Rezeptors die bereits auf mRNA-Ebene detektierte sportbedingte Expressionszunahme. Auch hier wurde die translationale Heraufregulation in den Läufern durch den Myokardinfarkt auf Kontrollniveau reduziert.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass das Adenosinrezeptor-System keiner Regulation durch das maladaptive kardiale Ereignis unterlag. Im Gegensatz dazu war die physiologische Hypertrophie von einer ausgeprägten Expressionszunahme aller Rezeptor-Subtypen auf mRNA-Ebene und einer gesteigerten Protein-Expression des A2a-Rezeptors begleitet. Demnach könnte also die Induktion der adaptiven Hypertrophie mit der Aktivierung des Adenosinrezeptor-Systems assoziiert sein. Folglich lässt sich die Beteiligung des Adenosin-Systems an der Ausprägung prognostisch günstiger Effekte des Ausdauertrainings vermuten. An der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie, induziert durch den Myokardinfarkt, scheint das Adenosin-System jedoch nicht beteiligt zu sein. Die durchgeführten Expressionsanalysen lieferten keinen Hinweis darauf, dass Transkriptionsstatus oder Proteinexpressionsmuster der Rezeptoren in trainierten Mäusen nach Infarkt im Vergleich zu untrainierten Mäusen nach Infarkt erhöht waren. Die Hypothese, dass Ausdauersport-vermittelte Kardioprotektion nach einem Myokardinfarkt eine Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems involviert, muss demnach verworfen werden.

## 5 Diskussion

Die pathologische Hypertrophie ist mit nahezu allen Formen der Herzinsuffizienz assoziiert. Sie stellt zunächst einen adaptiven Mechanismus des Herzens dar, um erhöhte systolische oder diastolische Wandspannung in Folge chronischer Druck- oder Volumenbelastung, neurohumoraler Überaktivierung und erhöhter sympathischer Aktivität zu kompensieren und somit die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten. Sie wird jedoch bei fortwährender chronischer Belastung graduell maladaptiver und mündet schließlich in der ventrikulären Dilatation, der myokardialen Fibrose und der kontraktile Dysfunktion. Dieser Remodeling-Prozess ist die Konsequenz hypertropher, fibrotischer, apoptotischer und inflammatorischer Ereignisse, sowie struktureller Veränderungen der extrazellulären Matrix.

Es wurden bereits zahlreiche Induktoren und Effektoren des maladaptiven Remodelings beschrieben. Hingegen ist die Zahl identifizierter Faktoren, die diesen chronischen Umbauprozessen entgegen wirken, begrenzt. Mittlerweile ist bekannt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer erhöhten Adenosinkonzentration assoziiert sind. Dem Autakoid werden zahlreiche kardioprotektive Effekte zugeschrieben, insbesondere unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen. *In vitro* Studien demonstrierten, dass eine selektive Adenosin-A1-Rezeptor-Aktivierung mittels CPA (N6-Cyclopentyladenosin) die durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin (PE) induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie hemmt (Liao et al., 2003; Gan et al., 2005). Pang und Kollegen zeigten zudem, dass die PE-induzierte hypertrophe Antwort *in vitro* von einer kompensatorischen Heraufregulation der Adenosinrezeptor-Subtypen A1, A2a und A3 begleitet war (Pang et al., 2010a). Weiterhin beobachtete die Gruppe um Kitakaze, dass ein selektiver A1-Rezeptor-Agonismus im Bluthochdruck-Modell von einer Reduktion der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und des Herzgewicht/Körpergewichts-Verhältnisses gekennzeichnet war, und, dass eine unselektive Aktivierung der Adenosinrezeptoren in diesem Schadensmodell die myokardiale Fibrose inhibiert (Liao et al., 2003). Wagner und Kollegen demonstrierten zudem, dass Adenosin die Sekretion von MMPs und pro-inflammatorischen Zytokinen in einigen kardialen und inflammatorischen Zelltypen hemmt. MMPs, die die extrazelluläre Matrix degradieren, spielen eine zentrale Rolle beim ventrikulären Remodeling, insbesondere nach Myokardinfarkt. Adenosinlevel sind nicht nur im in-

suffizienten Herzen und nach Myokardinfarkt, sondern auch nach Ausdauersport im Herzen erhöht. Ausdauertraining führt zur Induktion einer physiologischen Form der Hypertrophie, die weder mit systolischer oder diastolischer Dysfunktion, noch mit kardialer Fibrose assoziiert ist und insbesondere nicht in einer Herzinsuffizienz mündet. Diese adaptive Antwort des Herzens scheint über Aktivierung des Igf-I/PI3K-Signalwegs induziert zu werden. Es wurden mittlerweile zahlreiche kardioprotektive Effekte von Ausdauersport beschrieben und physische Aktivität nach Myokardinfarkt scheint, trotz teilweise divergierender Beobachtungen, günstige Effekte auf die ventrikuläre Dilatation und die kardiale Dysfunktion auszuüben bzw. einen Präventivmechanismus in Gang zu setzen, der die Induktion des myokardialen Remodelings nach Myokardinfarkt abschwächt.

## 5.1 Hypothese Teilprojekt 1

Die Hypothese des ersten Teilprojekts der vorliegenden Arbeit war, dass Adenosin-A1-Rezeptor-induzierte Mechanismen vor dem maladaptiven Remodeling in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation schützen.

### 5.1.1 Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha$ 1-adrenerg induzierte Hypertrophie *in vitro* über einen Rückkopplungsmechanismus

Um die Funktion des Adenosin-A1-Rezeptors, dem vorrangig die Adenosin-vermittelten anti-hypertrophen Effekte zugeschrieben werden, in Folge hypertropher Stimulation näher zu charakterisieren, wurde zunächst der Effekt einer A1-Rezeptor-Aktivierung auf die hypertrophe Antwort *in vitro* untersucht. Hierfür wurden isolierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten mit dem  $\alpha$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin, dem maladaptiven neurohumoralen Agens Angiotensin II und dem physiologischen Stimulus Igf-I stimuliert und weiterhin einer Behandlung mit dem selektiven A1-Rezeptor-Agonisten CPA unterzogen. Die durch Stimulationen mit Phenylephrin (PE) und Angiotensin II (AngII) induzierte hypertrophe Antwort war durch Zunahme der Sarkomerorganisation (Abb. 16), der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und der Proteinbiosynthese (Abb. 17) charakterisiert. Igf-I-vermittelte hypertrophe Antworten wurden durch Zunahme der Kardiomyozytengröße (Abb.17) und der Sarkomerorganisation (Abb. 16) verifiziert. Eine simultane Behandlung der Zellen mit CPA inhibierte die PE-, nicht aber die AngII- oder Igf-induzierte Hypertrophie. Diese

Beobachtung lässt vermuten, dass Adenosin durch Stimulation des A1-Rezeptors spezifisch die durch  $\alpha$ -adrenerge Stimulation induzierte, hypertrophe Antworten in Kardiomyozyten hemmt. Auf der anderen Seite hat die A1-Rezeptor Stimulation keinen Einfluss auf die Angiotensin II- oder Igf-I vermittelte Hypertrophie, wobei die erste eher als maladaptiv und letztere als eher adaptiv eingestuft wird. Die Gruppe um Kitakaze zeigte, dass eine unselektive Aktivierung des gesamten Adenosinrezeptor-Systems die PE-, die AngII- und die Endothelin-I-induzierte Zunahme der Proteinsyntheserate hemmte, demonstrierten eine spezifische inhibitorische Rolle des A1-Rezeptors bezüglich dieser hypertrophen Antwort, jedoch auch nur in Folge einer PE- und einer Forskolin-Stimulation in isolierten Kardiomyozyten (Liao et al., 2003). Obgleich sowohl PE, als auch AngII die pro-hypertrophe Signaltransduktion über G $\alpha$ q initiieren, inhibiert eine A1-Aktivierung in Kardiomyozyten also anscheinend nur die  $\alpha$ -adrenerg induzierte Signalkaskade. Weiterhin konnte auch die PE-bedingte Transkriptionssteigerung des molekularen Hypertrophie-Markers c-fos, dem als Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der frühen Hypertrophie zugeschrieben wird (Babu et al., 2000), durch gleichzeitige A1-Aktivierung abgeschwächt werden (Abb. 13). Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Studien, durchgeführt von Gan und Kollegen (Gan et al., 2005), und könnte auf eine bedeutende Rolle des A1-Rezeptors bei der Prävention der Hypertrophie in frühen Stadien hinweisen.

Expressionsanalysen ergaben, dass  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor-Stimulation durch PE in einer Expressionszunahme der A1-Rezeptor-mRNA resultierte (Abb. 18). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Pang (Pang et al., 2010a), lieferten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen, trotz Einsatz gleicher Konzentrationen der verwendeten Substanzen und identischer Stimulationszeiten, keine Hinweise auf eine zusätzliche Heraufregulation der Adenosinrezeptor-Subtypen A2a und A3 *in vitro* (Abb. 19). In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der Transkriptionsstatus des A2b-Subtyps untersucht, welcher ebenfalls unbeeinflusst von einer PE-Behandlung blieb (Abb. 19). Hingegen konnte die PE-bedingte Expressionssteigerung des A1-Rezeptors im Versuch auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 21). Die PE-abhängige Transkriptionssteigerung des A1-Rezeptors konnte durch Co-Inkubationsexperimente mit dem  $\alpha_1$ -adrenergen Antagonisten Prazosin inhibiert werden (Abb. 20). Darüber hinaus wurde keine Modulation der Rezeptor-Expression in Abhängigkeit hypertropher Stimulation mit steigenden Konzentrationen von AngII und

Igf-I detektiert (Abb. 20). Betrachtet man diese Resultate, zusammen mit den *in vitro* Beobachtungen von Pang und Kollegen, deren Untersuchungen zeigten, dass Endothelin-I und Aldosteron, als weitere humorale hypertrophe Stimuli, keinen Einfluss auf die A1-Rezeptor-Expression ausübten (Pang et al., 2010a), so liegt die Vermutung nahe, dass die Heraufregulation des A1-Rezeptors Folge pro-hypertropher  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation ist. Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass ein selektiver A1-Agonismus spezifisch die  $\alpha$ -adrenerg induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie inhibiert, die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation wiederum spezifisch die transkriptionelle und translationale Heraufregulation des A1-Rezeptors bewirkt, könnte auf einen Rückkopplungsmechanismus hinweisen, der verantwortlich und essentiell für die Adenosin-vermittelte anti-hypertrophe Wirkung in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation ist. Die erhöhte Rezeptordichte würde dann eine vermehrte Ligandenbindung des Substrats CPA nach sich ziehen und dadurch die protektive Wirkung des Adenosin-Analogons potenzieren. Somit würde das Ausbleiben einer Ang II- und einer Igf-I-abhängigen Expressionsregulation des Rezeptors das Ausbleiben seiner anti-hypertrophen Wirkung in Folge einer Behandlung mit diesen beiden hypertrophen Agentien erklären.

### **5.1.2 Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Hypertrophie *in vivo***

Neben der Funktionsanalyse des Adenosin-A1-Rezeptors im Zuge der Kardiomyozyten-Hypertrophie wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Effekt seiner Aktivierung auf den myokardialen Remodeling-Prozess unter chronischer maladaptiver Stimulation untersucht. Zu diesem Zwecke wurden männliche C57/Bl6 Mäuse einer kontinuierlichen Infusion mit PE in An- und Abwesenheit des A1-Agonisten CPA über subkutan implantierte osmotische Mini-Pumpen über einen Zeitraum von 3 Wochen unterzogen. Die Kontrolltiere erhielten ebenfalls eine Mini-Pumpen Implantation mit Abgabe einer physiologischen NaCl-Lösung. Die PE-induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie im Mausmodell wurde durch Zunahme des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses (Abb. 24), des Kardiomyozyten-Durchmessers, der –Querschnittsfläche (Abb. 25) und der Reaktivierung der fetalen Gene ANF und  $\beta$ -MHC (Abb. 26) bestätigt. Die simultane CPA-Behandlung resultierte in der Inhibition dieser maladaptiven Antworten. Bezüglich der  $\beta$ -MHC Genexpression zeigte sich, dass eine A1-Rezeptor-Stimulation per se in einer signifikanten Reduktion des Transkriptions-

status‘ gegenüber dem Kontrolllevel resultierte. Diese Beobachtung könnte auf einen Präventivmechanismus, induziert durch den A1-Rezeptor, während der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie über positive Beeinflussung der kardialen Kontraktibilität hinweisen.

Zusammengefasst wurde anhand dieser Ergebnisse erstmals die A1-Rezeptor- bzw. im Allgemeinen die Adenosin-vermittelte Inhibition der  $\alpha_1$ -adrenerg induzierten Hypertrophie *in vivo* gezeigt. Weiterhin weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die alleinige Aktivierung des A1-Rezeptor-Subtyps einen potenten Mechanismus der Adenosin-vermittelten anti-hypertrophen Wirkung *in vivo* repräsentiert. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von Liao und Kollegen gestützt, dass die Inhibition der Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsfläche und des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses durch den unselektiven Adenosinrezeptor-Agonisten CADO (2-Chloroadenosin) im Bluthochdruck-Modell durch CPA-Behandlung nachgeahmt werden konnte (Liao et al., 2003). Die anti-hypertrophen Effekte der A1-Aktivierung in der genannten Studie wurden nach 4-wöchiger Infusion von 5 mg/kg/Tag CADO determiniert. Im Gegensatz dazu wurde die Inhibition des  $\alpha$ -adrenerg induzierten hypertrophen Phänotyps in der vorliegenden Arbeit bereits durch 3-wöchige CPA-Behandlung mit lediglich 2 mg/kg/Tag vermittelt. Darüber hinaus war nach den Studien von Liao und Kollegen noch unklar, welcher prohypertroph wirkende Hormon-Signalweg im Rahmen der Hypertonie durch A1-Rezeptor Stimulation antagonisiert wurde. Die hier erarbeiteten *in vitro* und *in vivo* Daten liefern die Erkenntnis, dass dies durch A1-vermittelte Antagonisierung einer  $\alpha$ -adrenergen Stimulation bzw. im Hypertonie Modell durch sympathische Aktivierung mit Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin vermittelt wurde.

Konsistent mit dem Ausbleiben einer eindeutigen Herzgewichtszunahme in Folge der maladaptiven Stimulation (Abb. 24), konnten via Echokardiographie und MRT keine PE-bedingten Modulationen morphologischer Parameter nachgewiesen werden (Tabelle 29 und 30), die durch eine A1-Aktivierung hätten beeinflusst werden können. Weiterhin ergaben die beiden angewandten Bildgebungsverfahren keinen Hinweis auf eine kardiale Dysfunktion in Folge der  $\alpha$ -adrenergen Behandlung. Dies bestätigt das Vorliegen einer kompensierten Hypertrophie im etablierten Mausmodell.

Eine nicht-invasive Blutdruckmessung an der Schwanzarterie der Versuchstiere war aufgrund der vasokonstriktorisches Effekte des  $\alpha$ -adrenergen Agens nicht durchführbar. Studien, die sich des Einsatzes osmotischer Mini-Pumpen zur pharmazeutischen Behandlung bedienen, wiesen jedoch darauf hin, dass die Substanzen in solch niedrigen und stabilen Konzentrationen abgegeben werden, dass die Hämodynamik keinem signifikanten Einfluss unterliegt (Liao et al., 2003).

### **5.1.3 Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors antagonisiert die $\alpha$ 1-adrenerg induzierte Fibrose *in vivo***

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Stimulation mit dem pro-hypertrophen Stimulus Phenylephrin *in vivo* auch einen ausgeprägten fibrotischen Phänotyp provozierte. Der aus der PE-Behandlung resultierende linksventrikuläre Kollagengehalt von etwa 15% und der darauf zurückzuführende Ersatz kardiomyozytären Gewebes durch Fibroblasten könnte folglich eine Erklärung für die ausbleibende Gewichtszunahme der hypertrophierten Herzen nach PE-Behandlung darstellen (Abb. 24). Die kontinuierliche Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors bewirkte die vollständige Inhibition der PE-provozierten Fibrose (Abb. 27). Bisher wurde jedoch nur der anti-fibrotische Effekt unselektiver Adenosinrezeptor-Aktivierung (Liao et al., 2003) bzw. lediglich eine eindeutige Rolle des A2b-Subtyps bei der Vermittlung anti-fibrotischer Effekte in Ratten *in vitro* (Chen et al., 2004; Dubey et al., 1999; Dubey et al., 2001) und *in vivo* (Wakeno et al., 2006) dokumentiert. Dubey und Kollegen identifizierten den A2b-Rezeptor als den Subtyp, der die Fibrose, induziert durch FKS (Dubey et al., 1999) und PDGF-BB (Dubey et al., 2001), in kardialen Ratten-Fibroblasten inhibiert. Chen und Kollegen demonstrierten A2b-Rezeptor-vermittelte anti-fibrotische Effekte mit Hilfe von A2b-Überexpression und A2b-knock-down Experimenten in diesen Zelltypen (Chen et al., 2004). Darüberhinaus zeigten *in vivo* Studien eines Myokardinfarkt-Modells in Ratten, dass eine kontinuierliche A2b-Aktivierung günstige Effekte auf die Ausprägung der Fibrose und das ventrikuläre Remodeling ausübt (Wakeno et al., 2006). Spezies- und Zelltyp-abhängige Unterschiede und vor allem der Einsatz unterschiedlicher Fibrose-induzierender Faktoren könnten die divergierenden Beobachtungen erklären. Hier wurde erstmals eine Rolle des A1-Rezeptors als potenter Inhibitor  $\alpha$ -adrenerg induzierter kardialer Fibrose demonstriert. Die Fibrose scheint Phenylephrin TGF $\beta$ -unabhängig zu induzieren. Weiterhin war die PE-induzierte pro-fibrotische Antwort im

Versuch lediglich von einer tendenziellen Expressionssteigerung der CTGF- und Kollagen  $\alpha 2$ -codierenden Gene begleitet. Diese Expressionszunahmen waren unter simultanem A1-Agonismus nicht mehr detektierbar (Abb. 28). Der vorrangige Effektor der  $\alpha$ -adrenerg induzierten pro-fibrotischen Antwort scheint TNF $\alpha$  zu sein (Abb. 28). So provozierte das maladaptive Agens eine etwa 3-fache Transkriptionssteigerung dieses Fibrose-Induktors gegenüber dem Kontrolllevel. Die selektive A1-Rezeptor-Aktivierung führte per se ebenfalls tendenziell zur moderaten Expressionszunahme des Zytokins und reduzierte in Anwesenheit des maladaptiven Stimulus tendenziell das PE-induzierte Expressionslevel auf ein moderates Niveau (Abb. 28). Da nur hohe Konzentrationen des inflammatorischen Faktors TNF $\alpha$  maladaptiv wirken, moderate Level jedoch eine adaptive Antwort in Folge von Stressstimuli initiieren (Mann, 2003), stützt auch diese Beobachtung die Hypothese eines A1-Rezeptor-vermittelten adaptiven Effekts, der dem Übergang von der kompensierten Hypertrophie zur de-kompensierten Herzinsuffizienz entgegen wirkt.

#### **5.1.4 Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors hemmt die $\alpha$ -adrenerg induzierte Aktivierung des Remodeling-Effektors MMP-2**

Konsistent mit der PE-abhängigen Heraufregulation von TNF $\alpha$  und CTGF, welche in ihrer Funktion die Synthese der MMPs zu induzieren vermögen, wurde im Versuch eine deutliche PE-vermittelte Aktivierung der MMP-2 auf Proteinebene detektiert. Der selektive A1-Agonist CPA inhibierte die Aktivierung dieses bedeutenden Effektors der linksventrikulären Gefüge-Dilatation im Zuge des Remodeling-Prozesses vollständig und reduzierte das Expressionslevel der aktiven MMP tendenziell unterhalb des Kontrolllevels (Abb. 29). Somit weisen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Adenosin durch Stimulation des A1-Rezeptors eine protektive Rolle beim linksventrikulären Remodeling zukommt. Das Expressionsmuster der latenten Form der MMP-2 korrelierte invers mit dem Expressionsstatus der aktiven Form in den 4 Mausgruppen. Die Gruppe um Kitakaze dokumentierte lediglich eine Beteiligung des A2b-Subtyps an der Adenosin-vermittelten Inhibition der MMP-2 im Infarktmodell, beschränkte sich allerdings auf die Expressionsanalyse der latenten Isoform (Wakeno et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass der A2b-Subtyp die Synthese nach Infarkt, der A1-Subtyp die Aktivierung der MMP-2 in Folge maladaptiver Stimulation unterbindet und somit fibrotischen Prozessen und der Degeneration der EZM entgegen wirkt. Die Expressionsanalyse der latenten MMP-9 in der vorliegen-

den Arbeit unterlag keiner evidenten Modulation durch die verschiedenen Behandlungen (Abb. 29). Die aktive Form dieser Gelatinase konnte im Versuch in keiner der Mausgruppen detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die MMP-9 vorrangig mit den frühen Umbauprozessen nach einem Myokardinfarkt assoziiert ist (Tao et al., 2004). So identifizierten Wagner und Kollegen erhöhte MMP-9-Level als Risikomarker für das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt (Wagner et al., 2006). Zum Anderen demonstrierte die Arbeit von Wakeno eine infarktbedingte Expressionszunahme der latenten Proteinase im nicht-infarzierten Areal (Wakeno et al., 2006). Eine Studie an humanen Neutrophilen zeigte zudem, dass Adenosin die Sekretion der MMP-9 aus diesen Zellen hemmt (Ernens et al., 2006). Neutrophile werden als erste Gruppe inflammatorischer Zellen zum Infarkt-areal rekrutiert. Darüber hinaus wurden erhöhte Proteinlevel der MMP-9 in Makrophagen in Folge vaskulärer Schäden dokumentiert, die wiederum A2b-Rezeptor-abhängig herab reguliert wurden (Chen et al., 2011). Insgesamt lässt sich also vermuten, dass der MMP-9 vorrangig in Folge eines ischämischen Gewebeschadens und somit im Zuge des progressiven Remodelings nach Infarkt eine zentrale Bedeutung zukommt und hierbei anscheinend einer negativen Regulation durch Adenosin unterliegt, die Proteinase jedoch keine Funktion als Effektor bei der  $\alpha$ -adrenerg induzierten maladaptiven Antwort inne hat.

### **5.1.5 Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors inhibiert das $\alpha$ -adrenerg induzierte Remodeling durch Hemmung von oxidativem Stress**

Das nächste Ziel der vorliegenden Studie war die Klärung der Frage, an welchem Punkt der A1-Rezeptor-induzierte Signalweg mit der durch Phenylephrin angeschalteten Signalkaskade interferiert, um die PE-vermittelte maladaptive Antwort zu antagonisieren. Western-Blot Analysen konnten im Versuch keinen Hinweis auf eine Schlüsselrolle der extrazellulär regulierten Kinase ERK1/2 (ERK42/44) liefern (Abb. 30), trotz diverser Referenzen, die eine regulatorische Funktion der Kinase bei der G $\alpha$ q-vermittelten Induktion hypertropher Antworten belegen (Dorn und Force, 2005; Bueno und Molckentin, 2002). Darüber hinaus unterlagen weder AKT (Abb. 32) oder P70S6K (Abb. 33), als Komponenten des PI3K-Signalwegs, noch der durch diese Kinasen kontrollierte negative Regulator der Hypertrophie, GSK3 $\beta$  (Abb. 34), einer eindeutigen (differentiellen) Regulation durch Stimulation des Adenosin-A1- und des  $\alpha$ -Adrenorezeptors. *In vitro* Studien demonstrierten eine durch Phenylephrin provo-

zierte Zunahme der phosphorylierten ERK1/2 innerhalb von 5 Minuten nach Eingang des Stimulus (Gan et al., 2005, Xia et al., 2004) und eine Verschiebung des Expressionsverhältnisses zwischen Gesamtexpression der AKT und Expression der phosphorylierten Isoform in Richtung der aktiven AKT nach 30-minütiger PE-Behandlung (Xia et al., 2006). Beide Expressionsregulationen waren jedoch bereits nach 60 Minuten nicht mehr detektierbar. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der untersuchten Kinasen ein frühes Ereignis in Folge  $\alpha$ -adrenerger pro-hypertropher Stimulation darstellt und nach 3-wöchiger Behandlung *in vivo* nicht mehr nachzuweisen ist. Eventuell ist dies darauf zurückzuführen, dass nach 3-wöchiger chronischer maladaptiver Stimulation die kompensatorischen Mechanismen des Herzens erschöpft sind und adaptive Antworten, ausgelöst durch die untersuchten Kinasen ERK und AKT, bereits in maladaptive Antworten übergegangen sind. Dies würde ebenfalls die ausbleibende Phosphorylierung der beiden von AKT regulierten Kinasen P70S6K und GSK3 $\beta$  im Versuch erklären (Abb. 33, Abb. 34). Die Kinasen ERK, AKT und P70S6K unterliegen bekanntermaßen auch einer Aktivierung durch das Adenosinrezeptor-System. Studien, die dies belegen, wurden jedoch ebenfalls in isolierten Kardiomyozyten-Kulturen durchgeführt. Diese Studien demonstrierten z. B. eine Expressionszunahme der aktiven ERK innerhalb von 5 Minuten nach Stimulation der einzelnen Adenosinrezeptoren. Die Expression der Kinase hatte auch hier bereits nach 40 Minuten wieder ihr Basallevel erreicht (Germack and Dickenson, 2004; Williams-Pritchard et al., 2011). Dies könnte darauf hinweisen, dass Adenosinrezeptoren adaptive MAP-Kinasen, in Abwesenheit pathologischer Stressfaktoren, unmittelbar nach ihrer Ligandenbindung als Präventivmechanismus aktivieren, die angeschalteten Signalwege jedoch bei Ausbleiben maladaptiver Stimulation wieder abgeschaltet werden. So könnte die maladaptive Belastung eine Voraussetzung für die Induktion adaptiver Mechanismen, ausgelöst durch Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors, *in vivo* darstellen. Die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass AKT, als frühes Zielprotein der A1-induzierten Signalkaskade, nach einer definierten Periode wieder auf sein Basallevel reduziert wurde, down-stream Effektoren des „pro-survival“ Signalweges, wie P70S6K und GSK3 $\beta$ , jedoch in Anwesenheit maladaptiver Belastung als längerfristiger Effekt durch den A1-Agonismus aktiviert bleiben (Abb. 33, Abb. 34) und Adenosin dem Übergang der adaptiven in die maladaptive Hypertrophie durch Anschalten des PI3K-Signalweges, der „pro-survival“ Antworten auslöst, entgegenwirkt. Dies würde ebenfalls erklären,

warum die selektive A1-Aktivierung die Igf-I-induzierte physiologische Hypertrophie, die über Induktion des PI3K-Signalweges ausgelöst wird, *in vitro* nicht inhibiert (siehe 4.1.2).

Eine Schlüsselrolle bei der A1-Rezeptor-induzierten Kardioprotektion konnte der Regulation von oxidativem Stress, welcher in Folge einer  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation Gq/11-Protein gekoppelter Rezeptoren den Remodeling-Prozess in Kardiomyozyten inklusive der Entstehung interstitieller Fibrose vermitteln kann, zugeschrieben werden. Die PE-induzierte Bildung von 8-Hydroxy-Diguanosin (8OHDG), einem Marker für oxidativen Stress, konnte in Kardiomyozyten und nicht-kardiomyozytären ventrikulären Zelltypen durch simultane Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors vollständig aufgehoben werden (Abb. 35). Die zellulären Effekte vermehrter ROS-Produktion umfassen die elektromechanische Dysfunktion (Flesch et al., 1999), die Aktivierung adaptiver und maladaptiver MAP-Kinasen (Giordano, 2005), die Induktion der Apoptose (von Harsdorf et al., 1999), pro-fibrotische Ereignisse, die Kardiomyozyten-Hypertrophie (Sawyer et al., 2002) und die Aktivierung der MMPs 2 und 9 (Gardner et al., 2010). Dies sind allesamt Prozesse, die in direktem Zusammenhang mit dem linksventrikulären Remodeling-Prozess stehen. Es lässt sich folglich spekulieren, dass Adenosin durch Inhibition von oxidativem Stress der  $\alpha$ -adrenerg-induzierten maladaptiven Antwort - insbesondere der Fibrose und Hypertrophie - entgegenwirken und den Übergang von der kompensierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz verzögern kann.

Die Hypothese, dass die Hemmung oxidativen Stresses eine bedeutende regulatorische Funktion im Zuge Adenosin-mediierter Kardioprotektion spielt, wird durch Arbeiten der Gruppe um Karmazyn unterstützt. Sie demonstrierte, dass die Vermittlung anti-hypertropher Effekte via Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren in PE-behandelten neonatalen Kardiomyozyten durch Aktivierung/Öffnung von  $K_{ATP}$  Kanälen, welche wiederum die ROS-Produktion regulieren, von statten geht (Xia et al., 2007; Hoque et al., 2000). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass eine A1-Aktivierung unter hypoxischen Bedingungen die Öffnung der MPTP (Mitochondrial permeability transition pore), vermutlich über PKC-Aktivierung und Reduktion der ROS-Produktion in Folge der Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen hemmt (Xiang et al., 2010). Weiterhin beobachteten Narayan und Kollegen, dass eine A1-Stimulation die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, als Konsequenz einer Reoxygenierung nach Ischämie/Hypoxie, über Öffnung mitochondrialer  $K_{ATP}$ -Kanäle hemmt und darüber das

Ausmaß der kontraktile Dysfunktion in Folge der ROS-Produktion („Myocardial stunning“) eindämmt (Narayan et al., 2001). Eine Hemmung der maladaptiven ROS-Produktion unter hypoxischen und normoxischen, hypertrophen Bedingungen macht die Relevanz kardioprotektiver Effekte einer A1-Aktivierung umso deutlicher.

Die molekularen Mechanismen, die dieser Wirkung zu Grunde liegen, bzw. die Quelle der Phenylephrin-induzierten ROS-Produktion sollten weitere Arbeiten klären. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die beobachtete pro-hypertrophe und pro-fibrotische Bildung oxidativen Stresses, induziert durch Stimulation des Gαq-gekoppelten α-Adrenorezeptors, die Konsequenz mitochondrialer ROS-Produktion darstellt. So zeigten Kimura und Kollegen, dass eine Angiotensin II-vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase über Öffnung der mitochondrialen K<sub>ATP</sub>-Kanäle und Auslösung mitochondrialer ROS-Bildung zur kurzzeitigen Präkonditionierung führt (Kimura et al., 2005b). Zudem demonstrierte die Gruppe um Rabinovitch, dass das kardiale Remodeling, ausgelöst durch eine anhaltende Stimulation mit AngII, dessen Rezeptor ebenfalls Gαq-gekoppelt ist, durch spezifische Inhibition mitochondrialer ROS-Produktion mittels SS-31 oder durch mitochondrial-gerichtete Expression der Katalase (eines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminierenden Enzyms) in genetisch modifizierten Mäusen *in vivo* verhindert werden kann (Dai et al., 2011). Die Gruppe zeigte auch, dass die AngII-vermittelte ROS-Produktion durch Inhibition von Kanälen der inneren Mitochondrienmembran, wie der PTP (Permeability transition pore) und des IMAC (Inner membrane anion channel), unterbunden werden kann (Dai et al., 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass Gαq-induzierte NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Produktion eine vermehrte mitochondriale Radikal-Bildung nach sich zieht und somit eben hauptsächlich die mitochondriale ROS-Produktion für die Induktion des kardialen Remodelings verantwortlich ist. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Aktivierung der mitochondrialen K<sub>ATP</sub>-Kanäle eine Reduktion der ROS-Produktion nach sich zieht. Diese Aktivierung wurde wiederum bereits als Adenosin-vermittelter kardioprotektiver Effekt beschrieben (Narayan et al., 2001; Xiang et al., 2010).

#### **5.1.6 Alpha-adrenerge Stimulation führt zur kompensatorischen Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems *in vivo***

Die Expressions-Analysen des Adenosinrezeptor-Systems im verwendeten Mausmodell zeigten neben der bereits *in vitro* beobachteten Expressionszunahme des A1-

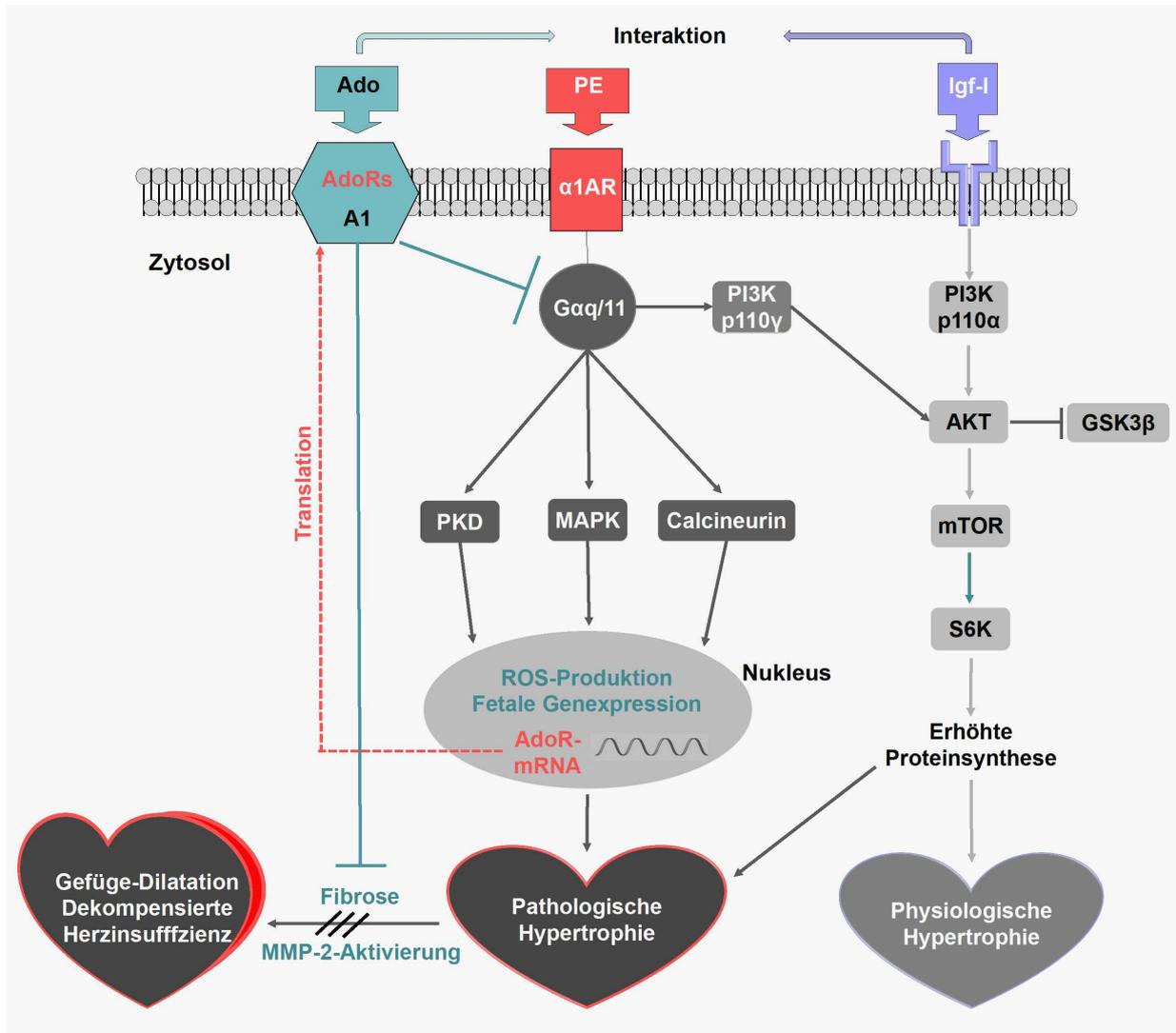
Rezeptors die deutliche translationale Heraufregulation der übrigen Rezeptor-Subtypen unter PE-Stimulation (Abb. 23). Somit konnte erstmals die Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems bei  $\alpha$ -adrenerg induzierter maladaptiver Antwort *in vivo* gezeigt werden. Wie bereits unter 5.1.1 diskutiert, kann nun spekuliert werden, dass diese Heraufregulation einen kompensatorischen Mechanismus repräsentiert, über den Adenosin die Hypertrophie in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation *in vivo* inhibiert. Im Mausmodell konnte die *in vitro* beobachtete PE-vermittelte Heraufregulation der A1-Rezeptor-mRNA nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine PE-abhängige Transkriptionszunahme des A3-Rezeptors detektiert (Abb. 23). Diese Unterschiede in den mRNA-Expressionsmustern der Rezeptor-Subtypen könnten darauf zurückzuführen sein, dass bei dem *in vivo* Modell der Effekt einer Langzeit-Behandlung über 3 Wochen, im *in vitro* Experiment hingegen der Effekt einer 24-stündigen Stimulation untersucht wurde. Dies ist kompatibel mit der Vorstellung, dass mRNA-Level des A1-Subtyps als ein frühes Ereignis in Folge hypertropher Stimulation herauf reguliert werden und nach einer definierten Periode auf das Basallevel zurückgehen. Neben den bereits erwähnten unterschiedlichen Stimulationszeiten muss beachtet werden, dass die *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit in neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt wurden, wohingegen die *in vivo* Studien an adulten Tieren vorgenommen wurden. Deswegen könnten Unterschiede im Alter der Versuchstiere/Zellen und folglich auch im Entwicklungszustand eine bedeutende Rolle bei der variierenden Heraufregulation der Adenosinrezeptoren spielen. Altersabhängige Diskrepanzen in den Expressionsmustern der Adenosinrezeptoren wurden bereits beschrieben (Ashton et al., 2003; Jenner et al., 2004). Weiterhin ist zu beachten, dass Expressionsmuster und -dichte der 4 Adenosinrezeptor-Subtypen je nach Zelltyp variieren und, dass die Expressionsanalysen in der Zellkultur in Kardiomyozyten, die Expressionsanalysen *in vivo* aber im Gesamtmyokard, also auch in nicht-kardiomyozytären Zelltypen, durchgeführt wurden.

### 5.1.7 Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 1

Zusammengefasst weist der erste Teil der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Adenosin-A1-Rezeptor einen potenten Inhibitor der Kardiomyozyten-Hypertrophie, der kardialen Fibrose und der MMP-2-Aktivierung repräsentiert. Den letztgenannten kardioprotektiven Effekt könnte der Rezeptor über eine Hemmung der ROS-Produktion und Regulation der TNF $\alpha$ -Produktion vermitteln. Dies wiederum könnte,

---

zusammen mit der kompensatorischen Heraufregulation der Adenosinrezeptoren, einen Präventivmechanismus widerspiegeln, über den Adenosin dem Remodeling-Prozess entgegenwirkt und so den Übergang von der kompensierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz verhindert. Welche Signalkaskaden an diesem Effekt beteiligt sind, sollen spätere Arbeiten klären. Die durch den A1-Rezeptor ausgelöste Aktivierung der GSK3 $\beta$  und der P70S6K in Gegenwart pathologischer Stimulation könnte jedoch darauf hinweisen, dass Adenosin tatsächlich seine kardioprotektiven Effekte in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation über Aktivierung anti-hypertropher Kinasen und Induktion des adaptiven PI3K-Signalwegs ausübt. Mittlerweile lieferten jedoch transgene Mausmodelle auch Hinweise darauf, dass konstitutive oder kontrollierte Überexpression des A1-Rezeptors mit einer Kardiomyopathie, ventrikulärer Hypertrophie und Fibrose, kardialer Dilatation und Dysfunktion inklusive einer verringerten Herzfrequenz und reduzierter Calcium-Zirkulation assoziiert ist (Funakoshi et al., 2006). Diese maladaptiven Antworten scheinen reversibel zu sein. Mechanismen, die zur moderaten Aktivierung oder Stabilisierung des A1-Rezeptors beitragen, könnten folglich einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen, um die Entwicklung der Herzinsuffizienz in Folge chronischer Druckbelastung des Herzens zu verhindern. Eine zusammenfassende Darstellung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 1 zeigt Abb. 57.



**Abb. 57: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 1**

Hypertrophe Stimulation des  $\alpha$ -Adreno-, nicht aber des AngII-, oder Igf-I-Rezeptors führt zur transkriptionellen und translationalen Heraufregulation des Adenosin-A1-Rezeptors *in vitro* und *in vivo*. Die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation im Mausmodell ist zudem von einer Heraufregulation des gesamten Adenosinrezeptor-Systems begleitet. Aktivierung des Adenosin-A1-Rezeptors inhibiert *in vitro* und *in vivo* die  $\alpha$ -adrenerg induzierte Kardiomyozyten-Hypertrophie. *In vivo* resultiert ein selektiver A1-Agonismus neben der Inhibition des fetalen Genprogramms, in der Hemmung der  $\alpha$ -adrenerg vermittelten Fibrose und der MMP-2-Aktivierung, vermutlich über Inhibition der ROS-Produktion. Dies könnte den Übergang von der kompensierten Hypertrophie in die dekompensierte Herzinsuffizienz verhindern. An der Antagonisierung dieser maladaptiven Progression scheint weiterhin die A1-Rezeptor bedingte Induktion adaptiver Mechanismen, wie die Aktivierung der P70S6K, als Endeffektor des Igf-I/PI3K-Signalweges, beteiligt zu sein. Somit scheint Adenosin, agierend über seinen A1-Rezeptor, die dekompensierte Hypertrophie in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu verhindern.  $\alpha$ 1AR= $\alpha$ 1-Adrenorezeptor, Igf-I=Insulin-like growth factor I, PI3K=Phosphatidylinositol-3 Kinase, mTOR=mammalian target of Rapamycin, S6K=Ribosomale S6 Kinase, PKD=Proteinkinase D, MAPK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase, TFs=Transkriptionsfaktoren, MMP-2=Matrixmetalloproteinase 2

## 5.2 Hypothese Teilprojekt 2

Die Hypothese des zweiten Teilprojekts lautete, dass körperliche Aktivität vor und nach Myokardinfarkt das Ausmaß des Remodelings abschwächt und somit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegen wirkt, und zwar durch Aktivierung des Igf-I/PI3K-Signalwegs und Stimulation des Adenosinrezeptor-Systems bzw. eventuell über ein Zusammenspiel der beiden Mechanismen. Um Aufschluss über die Effekte körperlicher Aktivität vor und nach Myokardinfarkt auf das Ausmaß des Remodelings, die Expression des Adenosinrezeptor-Systems und adaptiver Kinasen zu erlangen, wurden Wildtyp-Mäuse für 6 Wochen unter Standardbedingungen bzw. mit der Möglichkeit zum freiwilligen Lauftraining gehalten und anschließend einer permanenten LAD-Ligatur zur Induktion eines Myokardinfarktes bzw. einer Sham-Operation unterzogen. Nach weiteren 4 Wochen freiwilliger körperlicher Aktivität bzw. standardisierter Haltung wurde der kardiale Phänotyp anhand charakteristischer Merkmale prohypertropher und pro-fibrotischer Antworten, sowie funktionell und biochemisch charakterisiert.

### 5.2.1 Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen Einfluss auf adaptive Hypertrophie-Marker, schützt aber vor der Ausprägung maladaptiver Remodeling-Merkmale

Die Ergebnisse des Teilprojekts ergaben, dass Ausdauersport vor und nach Myokardinfarkt keinen Einfluss auf die Ausprägung von Hypertrophie-Markern besitzt, die dem adaptiven physiologisch hypertrophen und dem maladaptiven pathologisch hypertrophen Phänotyp gemein sind. Zu diesen Markern zählen die Zunahmen des Herzgewichtes, des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses, der Herzgewicht/Tibiallänge-Ratio, der Kardiomyozytengröße, der linksventrikulären Massen und Kavitätsgrößen (LV-Dilatation). Es ließ sich jedoch nicht feststellen, inwiefern die Ausprägung der untersuchten hypertrophen Merkmale in den trainierten Infarktieren das Resultat des physiologischen Stimulus des Ausdauertrainings oder des pathologischen Stimulus der Koronarokklusion darstellt. Die Untersuchungen hypertropher Merkmale, die nur für den maladaptiven Phänotyp charakteristisch sind, demonstrieren im Versuch hingegen eine Ausdauersport-vermittelte Prävention vor der Re-Expression fetaler Gene bei kleinen bis mittelgroßen Infarkten, eine Verschiebung des MHC-Expressionsverhältnisses zu Gunsten der adulten Isoform, eine Eindäm-

mung der Infarktexpansion und der Narbenausdünnung, sowie eine Hemmung der Fibrose im nicht-infarzierten Areal. Somit belegen die Beobachtungen dieses Teilprojekts eine kardioprotektive Wirkung von Ausdauersport auf den maladaptiven Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt.

#### **5.2.1.1 Induktion eines anterolateralen Myokardinfarktes führt zur Induktion der Myokard-Hypertrophie, unabhängig vom physischen Aktivitätsstatus der Versuchstiere**

Die Analyse morphologischer Charakteristika der Kardiomyozyten-Hypertrophie ergab, dass eine permanente LAD-Ligatur in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen zur Induktion einer hypertrophen Antwort im nicht-infarzierten Myokard führte. Aufgrund der bereits durch das Lauftraining induzierten physiologischen Hypertrophie lagen zwischen Sham-Läufern und MI-Läufern schwächere Unterschiede bezüglich der betrachteten Parameter vor als zwischen den beiden Gruppen untrainierter Mäuse. Die Analysen ergaben jedoch, dass Ausdauersport vor und nach Myokardinfarkt auf morphologischer Ebene keine Auswirkung auf das Ausmaß der Kardiomyozyten-Hypertrophie in Folge eines Myokardinfarktes hatte. So blieben Kardiomyozytengröße (Abb. 42), Herzgewicht, Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis (Abb. 41) und die linksventrikuläre Masse (Tabelle 31, 32, 33, 34) unbeeinflusst von der körperlichen Aktivität vor und nach Myokardinfarkt. Diese Beobachtungen decken sich mit Tierstudien, die die Effekte körperlicher Aktivität nach Myokardinfarkt untersuchten (De Waard et al., 2007, Xu et al., 2008). Demnach scheint auch das in der vorliegenden Arbeit zusätzlich durchgeführte körperliche Training im Vorfeld keinen Einfluss auf die Ausprägung des hypertrophen Phänotyps ausgeübt zu haben. Rengo und Kollegen beobachteten, dass 10-wöchiges Ausdauertraining nach Myokardinfarkt im Ratten-Modell zur Zunahme des Herzgewichtes und des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses gegenüber untrainierten Infarkttieren führte (Rengo et al., 2010). Diese divergierende Beobachtung könnte darauf zurück zu führen sein, dass das Lauftraining in dieser Studie erst 4 Wochen, in der vorliegenden Arbeit und der Studie der Gruppe um Zhang jedoch bereits innerhalb einer Woche nach LAD-Ligatur und im Infarktmodell von De Waard und Kollegen unmittelbar nach Infarktinduktion gestartet wurde (De Waard et al., 2007, Xu et al., 2008). Startpunktabhängige Unterschiede in den Effekten physischer Aktivität auf die Ausprägung des maladaptiven Phänotyps wurden bereits bezüglich der kardialen Funktion und Dilatation mehrfach dokumen-

tiert (Gaudron et al., 1994; Haykowsky et al., 2011). Darüber hinaus ist anzumerken, dass Rengo und Kollegen die Versuchstiere einem täglichen Trainingsprotokoll definierten Sauerstoffverbrauchs und definierter Dauer aussetzten, die vorliegende Studie und das Modell von De Waard jedoch freiwilliges Lauftraining als Trainingsmethode wählten. Folglich könnte der nachteilige Effekt der körperlichen Aktivität auf die Hypertrophie, der von Rengo und Kollegen beobachtet wurde, auf erhöhte kardiale Belastung bzw. Überanstrengung der Versuchstiere zurückzuführen sein.

### **5.2.1.2 Freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen schädigenden Einfluss auf die LV-Dilatation**

Echokardiographische Untersuchungen und MRT-Analysen bestätigten, dass freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt keinen Effekt auf die kardiale LV-Dilatation ausübte. So blieben infarktinduzierte Zunahmen der linksventrikulären Durchmesser und Volumina weitgehend unbeeinflusst von der körperlichen Aktivität vor und nach Myokardinfarkt (Tabelle 31, 32, 33, 34). Das Ausbleiben eindeutiger Hinweise auf die Induktion einer pathologischen Hypertrophie beim vergleichenden Betrachten der in den beiden Bildgebungsverfahren untersuchten Parameter in den beiden Laufgruppen ist darauf zurück zu führen, dass diese Tiere bereits durch das 10-wöchige Lauftraining eine adaptive exzentrische Hypertrophie mit vergrößerten linksventrikulären Durchmessern und Volumina entwickelt hatten und das Ausmaß der hypertrophen Antwort anscheinend nicht durch das maladaptive kardiale Ereignis potenziert wurde (Tabelle 31, 32, 33, 34). Das Ausbleiben eines evidenten Effektes von Ausdauertraining, das früh nach moderatem bis ausgeprägtem Myokardinfarkt gestartet wurde, auf die ventrikuläre Dilatation wurde bereits in klinischen Studien (Giannuzzi et al., 1993; Kim et al., 2011; Otsuka et al., 2003) und in Tierversuchen (Alhaddad et al., 1998) dokumentiert. Dennoch wiesen auch einige Untersuchungen in Mensch (Kubo et al., 2004) und Tier (Gaudron et al., 1994) auf nachteilige Auswirkungen körperlicher Aktivität auf das ventrikuläre Volumen nach großem Vorderwandinfarkt hin, wenn das Training früh nach dem Infarkt initiiert wurde, d. h., wenn der maladaptive Remodeling-Prozess noch in Gang war. Hingegen zeigten Untersuchungen im Ratten-Modell, dass spätes Training nach vollständigem Abheilen, d.h. mehr als 3 Wochen nach einem großen Myokardinfarkt keinen Effekt auf die LV-Dilatation ausübte (Libonati, 2003), oder eine solche abschwächte (Orenstein et al., 1995; Rengo et al., 2010). Es ist jedoch anzumerken, dass sich die angeführte *in vi-*

vo Studien zu den negativen Effekten eines frühen Trainings post Infarkt des Schwimmtrainings bedient hatte (Gaudron et al., 1994). Es bleibt also zu spekulieren, dass unterschiedliche startpunktabhängige Auswirkungen des Trainings im Tiermodell womöglich auf den beim Schwimmtraining ausgelösten mentalen und hämodynamischen Stress in der frühen Remodeling-Phase zurückzuführen sind. Das Ausbleiben schädigender Wirkungen des früh nach Infarktinduktion gestarteten Schwimmtrainings auf das ventrikuläre Volumen in der Studie von Alhaddad und Kollegen ist vermutlich darin begründet, dass die Versuchstiere hier keinem vergleichbar hohen Stress ausgesetzt waren. Die Arbeitsgruppe bediente sich eines moderaten Trainingsprotokolls mit lediglich 2 Trainingseinheiten pro Woche und einer 5-tägigen Dekonditionierung der Versuchstiere vor der Phänotypisierung (Alhaddad et al., 1998). Darüber hinaus könnte das Ausbleiben positiver Effekte körperlicher Aktivität auf die Dilatation in der vorliegenden Arbeit und in den Studien von Alhaddad und Libonati darauf zurückzuführen sein, dass das jeweilige moderate Training für lediglich 2-4 Wochen nach Infarkt durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Versuchstiere in den Studien, die positive Effekte auf die ventrikuläre Dilatation demonstrierten, für 6-10 Wochen trainiert (Orenstein et al., 1995; Rengo et al., 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht unbedingt nur der Startzeitpunkt des Trainings, sondern vor allem auch die Dauer seiner Durchführung darüber entscheidet, ob die linksventrikuläre Dilatation eingedämmt wird. Diese Hypothese wird von klinischen Studien gestützt. So dokumentieren diese, dass früh nach Infarkt begonnenes und über 12 Wochen fortgesetztes Training eine Zunahme der ventrikulären Volumina nach Myokardinfarkt provozierte (Kubo et al., 2004) und, dass innerhalb einer Woche nach Infarkt initiiertes Ausdauertraining, das mehr als 3 Monate durchgeführt wurde, die ventrikuläre Dilatation positiv beeinflusste und 6-monatiges Training die Dilatation am effizientesten abschwächte (Haykowsky et al., 2011).

### **5.2.1.3 Freiwilliges Training vor und nach Infarktinduktion wirkt der transmuralen Narbenausdünnung entgegen**

MRT-Analysen der kardialen Architektur demonstrierten, dass freiwilliges Lauftraining vor und nach großem Vorderwandinfarkt zu einer tendenziellen Abschwächung der infarktinduzierten Vorderwandausdünnung im gesamten linken Ventrikel führte (Abb. 39). Weiterhin lieferte die vergleichende Betrachtung der für 6 Wochen trainierten Versuchstiere vor Infarktinduktion und der für 10 Wochen trainierten Tiere 4 Wochen

nach LAD-Ligatur keinen Hinweis auf geometrische Veränderungen der Vorderwand (Abb. 40). Hingegen war dieser maladaptive Umbauprozess bei der Verlaufsbetrachtung untrainierter Infarkttiere, vor allem im Infarktareal, deutlich ausgeprägt (Abb. 40). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass vor und früh nach Induktion eines großen anterolateralen Myokardinfarktes initiiertes Ausdauertraining keine zusätzliche Narbenausdünnung bewirkt, sondern viel eher die Aufrechterhaltung der kardialen Architektur unterstützt. Kloner und Kloner, sowie Gaudron und Kollegen dokumentierten jedoch eine stärkere transmurale Narbenausdünnung, provoziert durch frühes kontinuierliches Schwimmtraining nach großem Vorderwandinfarkt (Gaudron et al., 1994; Kloner und Kloner, 1983). Diese divergierende Beobachtung lässt sich eventuell ebenfalls durch die beim Schwimmen enorme hämodynamische Belastung der Versuchstiere erklären. So zeigten Forschergruppen, die sich eines moderaten Schwimmprotokolls oder des Lauftrainings bedienten, keinen Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Vorderwanddicke (Alhaddad et al., 1998; Xu et al., 2008). Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Effekte könnte darin begründet sein, dass sich die genannten Studien echokardiographischer Untersuchungen zur Bestimmung der Wanddicken bedienten, was lediglich die eindimensionale Beurteilung derselben apikal des Papillarmuskels erlaubt und nicht des Wanddickenverlaufs im gesamten Ventrikel. Diese Erklärung wird dadurch gestützt, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten echokardiographischen Analysen – im Gegensatz zu den MRT-Untersuchungen - ebenfalls eine stärkere infarktbedingte Vorderwandausdünnung in trainierten Versuchstieren demonstrierten (Tabelle 31). Dies lässt vermuten, dass die abweichenden Untersuchungsergebnisse auf die Qualität des angewandten Bildgebungsverfahrens und eventuell auf die bei der Echokardiographie notwendige manuelle Einstellung der Schnittebene zurückzuführen sind.

Die MRT-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten weiterhin, dass freiwilliges Lauftraining per se in den Sham-Läufern zu einer tendenziellen Abnahme der Vorderwanddicke gegenüber den Sham-Kontrollen führte. Darüberhinaus resultierte die Induktion der pathologischen, als auch der physiologischen Hypertrophie gegenüber den Sham-Kontrollen tendenziell in einer leichten Ausdünnung des interventrikulären Septums und der Lateralwand (Abb. 39). Die beobachtete leichte tendenzielle Ausdünnung dieser Wandbereiche in den Infarkttieren lässt sich dadurch erklären, dass die pathologische Hypertrophie im Modell durch einen anterolateralen Myokardinfarkt

induziert wurde, und somit die an die Vorderwand angrenzenden Wandbereiche durch die Infarktexpansion in Mitleidenschaft gezogen wurden. Es lagen jedoch keine Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Infarkttieren vor. Die kardiale Hypertrophie, ausgelöst durch Ausdauertraining, stellt die Konsequenz einer chronischen Volumenbelastung dar. Diese wiederum mündet in der Streckung der Kardiomyozyten und somit in der exzentrischen Hypertrophie mit vergrößerten Kavitäten und relativ dünnen Wänden (Opie et al., 2006), was die tendenzielle Ausdünnung der LVAW, der LVLW und des IVS nach 10-wöchigem Ausdauertraining der Sham-Läufer gegenüber den Sham-Kontrollen erklären könnte. Diese sportinduzierten Ausdünnungen der genannten Wände werden beim Vergleich der 6 Wochen trainierten Mäuse vor Infarktinduktion mit den untrainierten Mäusen vor dem operativen Eingriff im MRT nicht sichtbar (Abb. 40). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine 6-wöchige Trainingsphase nicht ausreicht, um eine ausgeprägte Form der physiologischen Hypertrophie zu induzieren. Die MRT-Untersuchungen der Tiere vor und nach Infarktinduktion zeigten viel eher, dass die 4-wöchige permanente Koronarokklusion in körperlich inaktiven und aktiven Mäusen zur tendenziellen Dickenzunahme des IVS und der Lateralwand im mittventrikulären Bereich führte (Abb. 40). Dies lässt sich vermutlich durch den Altersunterschied und folglich den unterschiedlichen kardialen Entwicklungszustand der Versuchstiere vor LAD-Ligatur (12-14 Wochen alt, siehe Studiendesign Abb. 36) und 4 Wochen nach dem operativen Eingriff (17-19 Wochen alt) erklären. Dennoch wiesen die echokardiographischen Analysen auf eine Ausdünnung des IVS im Verlauf der beiden Infarktgruppen hin (Tabelle 32). Die Verdickung der Hinterwand, als Markenzeichen des pathologisch hypertrophierten Herzens konnte lediglich im Ultraschall beim Vergleich der Versuchstiere vor und 4 Wochen nach Koronarokklusion, unabhängig vom Aktivitätsstatus der Mäuse, beobachtet werden (Tabelle 32). Darüberhinaus lieferten die echokardiographischen Analysen, nicht die MRT-Untersuchungen, auch Hinweise auf diesen infarktbedingten und Ausdauersport-induzierten kompensatorischen Umbauprozess beim Vergleich zwischen MI-Kontrollen bzw. Sham-Läufern und Sham-Kontrollen (Tabelle 31). Die Tatsache, dass die linksventrikuläre Hinterwand und das interventrikuläre Septum echokardiographisch in eindimensionaler Längsachsenprojektion gemessen wurden, im MRT jedoch in zweidimensionaler Kurzachsenprojektion, könnte die divergierenden Beobachtungen erklären. Weiterhin bleibt zu erwähnen, dass im MRT lediglich die Versuchstiere mit ausgeprägten Vorderwandinfarkten analysiert wurden und die An-

zahl der untersuchten Mäuse somit deutlich geringer ausfiel. Zusammengefasst ergaben die durchgeführten Untersuchungen, unabhängig vom angewandten Bildgebungsverfahren, wie bereits in anderen Studien dokumentiert, keinen eindeutigen Hinweis auf schädigende oder günstige Einflüsse kontinuierlichen Ausdauertrainings auf infarktinduzierte geometrische Umbauvorgänge nicht-infarzierter Wände (Kloner und Kloner, 1983, Xu et al., 2008). Die beobachtete Lauftraining-vermittelte Prävention der Vorderwandausdünnung im Infarktareal weist jedoch eindeutig auf einen protektiven Mechanismus kontinuierlicher körperlicher Aktivität nach Myokardinfarkt hin. Dieser könnte langfristig eine Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität gewährleisten und das Risiko einer letalen Ventrikelruptur nach Myokardinfarkt eindämmen.

#### **5.2.1.4 Freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt hat keinen Einfluss auf die ventrikuläre Funktion**

Neben der LV-Dilatation zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass freiwilliges Lauftraining 6 Wochen vor und 4 Wochen nach Infarktinduktion keinen positiven Einfluss, aber auch keine schädigende Wirkung auf die kardiale Funktion ausübte. So blieb die infarktinduzierte Abnahme der Ejektionsfraktion unbeeinflusst vom Aktivitätszustand der Versuchstiere (Tabelle 33 und 34). Tierstudien, die ebenfalls die Effekte von früh nach Infarkt initiiertem Lauftraining auf die kardiale Funktion untersuchten, dokumentierten eine verbesserte Ejektionsfraktion und Verkürzungsfraktion als Folge 8-wöchiger physischer Aktivität (De Waard et al., 2007; Xu et al., 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte 4-wöchige Lauftraining der Versuchstiere nach Infarkt nicht ausreicht, um die prognostisch günstigen Effekte von Ausdauertraining auf die ventrikuläre Funktion zu erzielen. Weiterhin weist dies darauf hin, dass das vor der Infarktinduktion durchgeführte Lauftraining keine präventive Wirkung ausübte. Eine Studie, die den Effekt von kontinuierlich durchgeführtem 8-wöchigem Schwimmtraining vor Infarktinduktion auf die Pumpfunktion im Rattenherz untersuchte, konnte ebenfalls keine Kardioprotektion durch Ausdauertraining im Vorfeld einer LAD-Ligatur verzeichnen (Veiga et al., 2011). Somit scheint eine Verbesserung der ventrikulären Funktion vorrangig durch kontinuierlich durchgeführtes Ausdauertraining nach Ablauf des Infarktes induziert zu werden, wobei die Dauer des Trainings einen entscheidenden Faktor darzustellen scheint, um eine Verbesserung der ventrikulären Funktion zu erzielen. Rengo und Kollegen verzeichneten jedoch keinen Effekt von 10-wöchigem Lauftraining nach

Myokardinfarkt auf die EF, starteten das Training aber erst 4 Wochen nach Infarktinduktion (Rengo et al., 2010). Dies legt erneut die Vermutung nahe, dass nicht nur die Dauer, sondern auch der Startzeitpunkt des Trainings nach Infarkt darüber bestimmen, ob sich das Training günstig auf die kardiale Funktion auswirkt oder ohne Effekt bleibt. So wiesen auch klinische Studien darauf hin, dass innerhalb einer Woche nach dem kardialen Ereignis einsetzendes und über 6 Monate fortgeführtes Training die Auswurfraction am effizientesten verbessert (Haykowski et al., 2011; Kim et al., 2011).

Die permanente LAD-Ligatur führte in körperlich aktiven und inaktiven Mäusen im Versuch lediglich zur Abnahme der Ejektionsfraktion, als Funktionsparameter, übte jedoch keinen Einfluss auf die Verkürzungsfraktion (Tabelle 31 und 32), das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen aus (Tabelle 33 und 34). Das Schlagvolumen errechnet sich aus der Differenz aus enddiastolischem und endsystolischem Volumen. Da beide Volumina im Versuch infarktbedingt gleichermaßen vergrößert waren, blieb deren Differenz und somit das Schlagvolumen unbeeinflusst von der permanenten LAD-Ligatur in trainierten und untrainierten Mäusen. Da die Herzfrequenz unter den moderat sedativen Bedingungen während der kardialen MRT-Untersuchungen keiner Beeinflussung durch den Infarkt oder körperliche Aktivität unterlag, blieb ebenfalls das Herzzeitvolumen, das aus Schlagvolumen und Herzfrequenz kalkuliert wird, und neben der EF als Maß für die Pumpfunktion gilt, in den verschiedenen Behandlungsgruppen weitestgehend unverändert.

Patienten mit Myokardinfarkt weisen eine verringertes Schlagvolumen und Herzzeitvolumen auf, die Literatur liefert jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutigen Referenzen bezüglich der Auswirkung eines Myokardinfarktes auf Schlagvolumen oder Herzzeitvolumen im Tiermodell. Das Ausbleiben eines eindeutigen infarktbedingten Effektes auf SV, HZV und die Verkürzungsfraktion lässt sich eventuell dadurch erklären, dass ventrikuläre Wandspannung und Pumpfunktion im durchgeführten Tierversuch innerhalb der ersten 4-5 Wochen nach Infarkt noch weitgehend durch die kompensatorischen Mechanismen der induzierten Kardiomyozyten-Hypertrophie aufrechterhalten wurden und maladaptive Veränderungen erst nach länger währender chronischer Belastung zu verzeichnen sind, sobald die adaptiven Mechanismen des Herzens erschöpft sind. Die Tatsache, dass Tierstudien eine infarktbedingte Verschlechterung der Verkürzungsfraktion innerhalb einer Woche nach Infarktinduktion

verzeichneten (Dayan et al., 2005; Tang et al., 2011), lässt sich wiederum dadurch erklären, dass die kardialen Umbauvorgänge zu dieser Zeit zwar bereits in Gang gesetzt sind, aber noch keinen deutlichen kompensatorischen Effekt verursachen. Dies wiederum weist auf die Notwendigkeit eines frühen Startzeitpunktes von Ausdauertraining nach Myokardinfarkt hin, um das maladaptive Remodeling bereits in der initialen Phase durch Induktion sportbedingter adaptiver Mechanismen positiv beeinflussen zu können.

Die Untersuchung hämodynamischer Effekte ergab keine pathologisch relevanten Veränderungen des systolischen oder diastolischen Druckes in den beiden Infarktgruppen. Die während der Blutdruckmessung aufgezeichneten Herzfrequenzen der Tiere im Wachzustand waren nach 10-wöchigem (Tabelle 35), nicht nach 6-wöchigem (Tabelle 36) Lauftraining in den Versuchstieren leicht erhöht. Somit liegt die Vermutung nahe, dass das Lauftraining, unabhängig vom durchgeführten operativen Eingriff, frequenzsteigernd wirkte und die Frequenzzunahme positiv mit der Trainingsdauer korreliert. Basierend auf dem Wissen über humanphysiologische Veränderungen in Folge von Ausdauersport sollte man eine sportbedingte Frequenzabnahme („Sportlerpuls“) erwarten. Es bleibt jedoch anzumerken, dass die Frequenzwerte der trainierten Mausgruppen eher der physiologischen Norm von Wildtyp-Mäusen entsprechen als diejenigen der physisch inaktiven Tiere.

#### **5.2.1.5 Ausdauertraining vor und nach Infarktinduktion schützt bei moderaten Infarktgrößen vor der Reaktivierung fetaler Gene**

Bei Untersuchung der zellulären Charakteristika einer pathologisch hypertrophen Antwort zeigte sich, dass das fetale Gen ANF in der Laufgruppe erst ab einem Fibroseanteil von über 50% im Infarktbereich tendenziell auf bzw. über Sham-Level exprimiert wurde (Abb. 45), in den Kontrollen bereits bei einem Fibroseanteil im Infarktareal zwischen 15 und 40% einer deutlichen Expressionssteigerung gegenüber den Sham-Tieren unterlag (Abb. 44). Das Expressionsmuster korrelierte hier positiv mit der Infarktgröße. Dieser Trend spiegelte sich jeweils im Expressionsstatus des fetalen Gens  $\beta$ -MHC wider (Abb. 44 und Abb. 45). Die divergente transkriptionelle Regulation, abhängig vom Ausdauersport, könnte, gepaart mit der Beobachtung, dass Ausdauersport per se (Abb. 43) und in Folge großer Infarkte tendenziell (Abb. 45) zur Expressionssteigerung des adulten kontraktilen Filaments  $\alpha$ -MHC führte und eine Verschiebung des MHC-Expressionsverhältnisses zu Gunsten der adulten Isoform

bewirkte (Abb. 46), auf einen sportinduzierten Effekt hinweisen, der eine gesteigerte ATPase-Aktivität und somit eine verbesserte Myofilament-Funktion involviert. Auch Studien im Ratten-Modell hatten bereits gezeigt, dass körperliche Aktivität nach transients (Hashimoto et al., 2004) und permanenter (Rengo et al., 2010) Koronararterien-Ligatur zur Umkehr des  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC Shifts in Richtung des adulten Phänotyps führte und die ANF-Expression inhibierte. Diese Beobachtungen unterstützen den langfristigen Einsatz früh initiierten kontinuierlichen Ausdauertrainings nach Myokardinfarkt zur Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität.

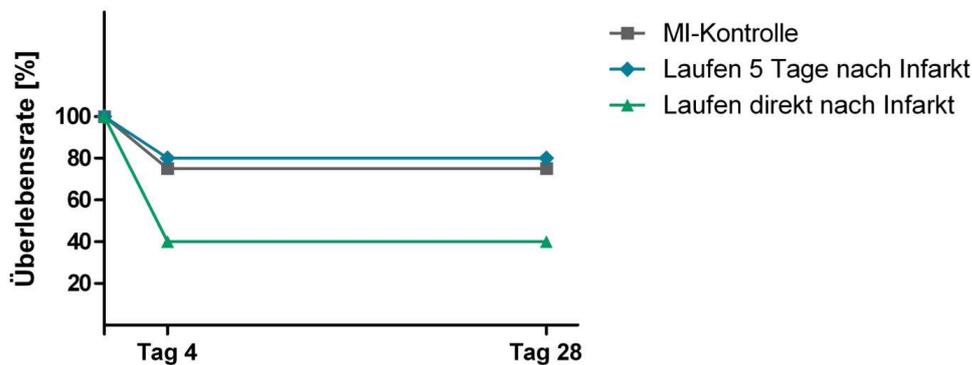
#### **5.2.1.6 Ausdauertraining vor und nach Myokardinfarkt schwächt die profibrotische Antwort und die Infarktexpansion ab**

Freiwilliges Lauftraining vor und nach LAD-Ligatur reduzierte den infarktbedingten Kollagengehalt im gesamten linken Ventrikel, im Infarktareal und tendenziell im nicht-infarzierten Bereich (Abb. 47). Letztgenannter protektiver Effekt wurde auch bereits nach Myokardinfarkt durch 8-wöchiges Lauftraining in Mäusen und Ratten beobachtet (De Waard et al., 2007; Xu et al., 2008). Ob die Hemmung pro-fibrotischer Antworten in der vorliegenden Arbeit bereits durch 4-wöchiges Ausdauertraining nach Infarkt initialisiert wurde, oder ob die zusätzliche körperliche Aktivität im Vorfeld zu den vergleichbaren Effekten eines 8-wöchigen Trainings führte, müssen spätere Arbeiten klären. Die hier demonstrierte deutliche Reduktion des Fibroseanteils im Infarktreal trainierter Tiere wurde kürzlich auch als protektiver Effekt, ausgelöst durch Ausdauertraining vor (Tang et al., 2011) und nach Infarktinduktion (Yengo et al., 2012), dokumentiert. Dies weist daraufhin, dass Ausdauersport der Infarktexpansion, als charakteristisches Merkmal des frühen Remodelings nach Infarkt, entgegen wirken könnte. Dieser Effekt könnte auf die in den durchgeführten Expressionsanalysen beobachtete tendenzielle Hemmung der MMP-9-Aktivierung in trainierten Infarkttieren zurückzuführen sein (Abb. 49). Die MMP-9 ist maßgeblich an der ventrikulären Dilatation, der Degradation des Kollagennetzwerks und somit an der Ausbreitung des Infarktareals in der frühen Remodeling-Phase beteiligt (Peterson et al., 2000). Die verhältnismäßig schwache Heraufregulation der aktiven MMP-2 nach 4-wöchiger LAD-Ligatur (Abb. 49), lässt sich dadurch erklären, dass dieser Gelatinase eher eine Rolle bei den späten Umbauprozessen, ab frühestens 3 Wochen nach Myokardinfarkt, zukommt (Vanhoutte et al., 2006). Weiterhin wird dieser Protease keine Bedeutung bei der Ausbreitung des infarzierten Bereichs zugeschrieben. Ihre Funktion ist

auf die linksventrikuläre Dilatation und die Fibroseinduktion beschränkt (Vanhoutte et al., 2006). Tierstudien bestätigten bereits, dass eine Inhibition der MMPs das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt abschwächt (Mukherjee et al., 2003; Rohde et al., 1999). Somit weisen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit erstmals auf einen protektiven Mechanismus des Ausdauertrainings auf die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix und die Infarktausbreitung hin, der mit einer Regulation der MMP-9-Aktivierung assoziiert ist. Diese Folgerung wird weiterhin dadurch gestützt, dass das freiwillige Lauftraining in den untersuchten Infarkttieren zur Reduktion des potenten MMP-Aktivators TNF $\alpha$  um den Faktor 5 führte (Abb. 48). Diese Beobachtungen lassen auch vermuten, dass körperliche Aktivität den ventrikulären Remodeling-Prozess durch Hemmung inflammatorischer Prozesse abschwächt.

Eine Expressionszunahme von CTGF wurde lediglich in den trainierten Infarkttieren detektiert (Abb. 48). Der Wachstumsfaktor vermag MMPs und deren Inhibitoren, die TIMPs, hoch zu regulieren, die extrazelluläre Matrix zu degradieren und zu synthetisieren. Eine CTGF-bedingte Synthese der EZM und eine Hemmung der MMPs könnten weiterhin an der Inhibition der Infarktausbreitung beteiligt sein. Die Beobachtung, dass physische Aktivität die Fibrose nach Infarkt abschwächte, jedoch keinen Einfluss auf den pro-fibrotischen Faktor TGF $\beta$  oder die Kollagen I $\alpha$ 2-Expression ausübte (Abb. 48), deckt sich mit den experimentellen Ergebnissen von Xu und Kollegen (Xu et al., 2008) und könnte weiterhin die vorrangige Bedeutung einer Inhibition der MMP-9 und des Zytokins TNF $\alpha$  bei den kardioprotektiven Effekten des Ausdauertrainings unterstreichen. Durch Hemmung der MMP-9 könnte exzessiver Fibrose und somit dem Verlust der kardialen Flexibilität und Funktion entgegen gewirkt werden. Da die MMP-9 im Menschen vor allem in der frühen Remodeling-Phase, d. h. zwischen dem 7. und 21. Tag nach Myokardinfarkt, vermehrt exprimiert und aktiviert wird (Peterson et al., 2006), scheint es von entscheidender Bedeutung zu sein, das Ausdauertraining etwa eine Woche nach dem kardialen Ereignis zu beginnen, um den bestmöglichen kardioprotektiven Effekt zu erzielen. Ein Trainingsbeginn innerhalb der ersten 5 Tage scheint jedoch erhebliche negative Auswirkungen auf die Überlebensrate zu besitzen und ist somit nicht anzuraten. So zeigten Vorstudien der vorliegenden Arbeit, dass 60% physisch aktiver Mäuse innerhalb der ersten 4 Tage nach Myokardinfarkt starben, sofern die Möglichkeit des freiwilligen Lauftrainings unmittelbar nach dem operativen Eingriff gegeben war (siehe nachstehende Abb.

57). Ähnliche Ergebnisse demonstrierte auch die Studie von Gaudron und Kollegen (Gaudron et al., 1994). Bei der im eigenen Versuch angewandten 5-tägigen Ruhephase nach Infarktinduktion, belief sich die Sterberate trainierter Versuchstiere auf lediglich 20%. Verglichen mit einer 25%igen Sterberate untrainierter Tiere, lieferten diese Werte keinen Hinweis darauf, dass die körperliche Aktivität negative Auswirkungen auf die Überlebensrate ausübte, sofern eine kurze trainingsfreie Phase nach Infarkt eingehalten wurde (siehe Abb. 57).



**Abb. 58: Prozentuale Überlebensrate nach Induktion des anterolateralen Myokardinfarktes**

Prozentuale Überlebensrate nach Induktion des anterolateralen Myokardinfarktes in MI-Kontrollen, in MI-Läufern (n=29), denen unmittelbar nach dem operativen Eingriff die Möglichkeit zum Lauftraining gegeben war (n=12), und in MI-Läufern, die erst in Folge einer 5-tägigen Ruhephase nach Infarktinduktion das freiwillige Laufen fortsetzen konnten (n=24).

### 5.2.2 Die Hypertrophie-Induktion in Folge chronischer Volumenbelastung ist mit der Aktivierung des PI3K-Signalwegs assoziiert

Expressionsanalysen zeigen, dass die Ausdauersport-induzierte Signaltransduktion im untersuchten Mausmodell Komponenten des PI3K-Signalwegs involvierte, wie bereits von zahlreichen Forschergruppen dokumentiert (DeBosch et al., 2006; McMullen et al., 2003, McMullen et al., 2004b). Das durch insgesamt 10-wöchiges Lauftraining physiologisch hypertrophierte Herz der Sham-operierten Laufmäuse wies keine Veränderung der AKT-Gesamtexpression auf, war aber von einer Hyperphosphorylierung am Serinrest 473 gekennzeichnet (Abb. 50). Diese AKT-Aktivierung im Zuge der adaptiven Hypertrophie wurde auch von den Arbeitsgruppen um Kemi und Gosselin im Tiermodell beobachtet (Gosselin et al., 2006; Kemi et al., 2008) und war dort, wie in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls von einer P70S6K-Phosphorylierung begleitet (Abb. 51). Die pathologische Hypertrophie hingegen, in-

duziert durch TAC (Transaortic constriction), wies sich in der Studie von Kemi und Kollegen durch eine Inaktivierung der P70S6K aus. Somit postulierte die Arbeitsgruppe, dass die physiologische Hypertrophie mit Aktivierung und die pathologische Hypertrophie mit Inaktivierung des AKT/mTOR Signalwegs assoziiert ist (Kemi et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit war jedoch auch das pathologisch hypertrophierte Herz der Kontrollen nach Myokardinfarkt von einer Aktivierung der beiden Komponenten des PI3K-Signalwegs begleitet, was wiederum mit den Beobachtungen von Gosselin übereinstimmt (Gosselin et al., 2006). Weiterhin wies die Kombination der pathologischen und physiologischen Hypertrophie in den MI-Läufern das gleiche Expressionsmuster bezüglich der betrachteten Kinasen auf (Abb. 50 und Abb. 51). Da ein Myokardinfarkt eine Kombination aus exzentrischer und konzentrischer Hypertrophie darstellt, d. h., dass das Herz einer chronischen Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt ist, Ausdauersport zur erhöhten Volumenbelastung führt, eine Konstriktion der Aorta jedoch nur eine Druckbelastung des Myokards nach sich zieht, lässt sich spekulieren, dass die Induktion des PI3K-Signalwegs vorrangig mit einem hypertrophen Stimulus assoziiert ist, der zur erhöhten Volumenbelastung führt. Dies würde die divergierenden Beobachtungen erklären.

Eine Konsequenz der AKT/P70S6K-Aktivierung stellt die Phosphorylierung/Inaktivierung der GSK3 $\beta$  dar. So schien die Entwicklung der physiologischen und der pathologischen Hypertrophie-Variante in der vorliegenden Arbeit, wie von Haq und Kollegen postuliert (Haq et al., 2000), eine Inaktivierung des negativen Regulators der Hypertrophie, GSK3 $\beta$ , vorauszusetzen (Abb. 52). Die durchgeführten Expressionsanalysen lieferten jedoch keinen Hinweis darauf, dass freiwilliges Lauftraining zur vermehrten Expression adaptiver Kinasen des PI3K-Signalwegs führte und somit maladaptiven Mechanismen, induziert durch den anterolateralen Myokardinfarkt, entgegen wirken könnte.

### **5.2.3 ERK ist an der Induktion der pathologischen, nicht der physiologischen Hypertrophie beteiligt**

Die Kinase ERK42/44 erfuhr im Versuch eine vermehrte Expression und Aktivierung durch Induktion des Myokardinfarktes, unabhängig vom Aktivitätszustand der Versuchstiere (Abb. 53 und Abb. 54). Das freiwillige Lauftraining per se zog keine Modulation der extrazellulär regulierten MAP-Kinase nach sich (Abb. 53 und Abb. 54). Obwohl eine Beteiligung der Kinase an der adaptiven Antwort spekuliert wird, de-

monstrierten auch Gosselin und Kollegen, dass durch freiwilliges Lauftraining induzierte physiologische Hypertrophie keine Expressionszunahme oder Aktivierung der ERK provozierte, die pathologische Hypertrophie in Folge eines Myokardinfarktes aber von einer solchen Regulation der Kinase begleitet war (Gosselin et al., 2006). Weiterhin dokumentierte die Gruppe um Miyautchi, dass eine einmalige akute Trainingseinheit, die einen mechanischen Stressstimulus für das Herz darstellt, in untrainierten Ratten zur zeitabhängigen Heraufregulation der ERK führte, dieser Effekt aber bei regelmäßigem moderatem Lauftraining und somit mit der Entwicklung einer physiologischen Hypertrophie graduell abnahm (Iemitsu et al., 2006). Diese Studien unterstützen die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die Signaltransduktion zur Induktion der physiologisch hypertrophen Antwort, im Gegensatz zur pathologisch hypertrophen Antwort, keine Beteiligung der ERK involviert. Darüber hinaus scheint Ausdauertraining auch nicht Expression und/oder Aktivierung der (maladaptiven) Kinase nach Myokardinfarkt zu inhibieren. Folglich konnte der Kinase keine Schlüsselrolle bei der Vermittlung sportinduzierter kardioprotektiver Effekte zugeschrieben werden.

#### **5.2.4 Induktion eines Myokardinfarktes in körperlich aktiven Mäusen hemmt das Adenosinrezeptor-System**

Das Adenosinrezeptor-System unterlag weder einer transkriptionellen, noch einer translationalen Regulation durch eine permanente Koronararterien-Okklusion (Abb. 55 und Abb. 56 D). Im Gegensatz dazu war eine physiologische Hypertrophie per se von einer ausgeprägten Expressionszunahme aller Rezeptor-Subtypen auf mRNA-Ebene und einer gesteigerten Protein-Expression des A<sub>2a</sub>-Rezeptors begleitet (Abb. 55 und Abb. 56 D). Demnach scheint es, dass die Induktion der adaptiven Hypertrophie mit der Aktivierung des Adenosinrezeptor-Systems assoziiert ist. Folglich lässt sich die Beteiligung des Adenosin-Systems an der Ausprägung prognostisch günstiger Effekte des Ausdauertrainings vermuten. Die Tatsache, dass die in den physiologisch hypertrophierten Herzen der Sham-Läufer auf mRNA-Ebene beobachtete ausgeprägte Expression der Rezeptor-Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2b</sub> und A<sub>3</sub> auf Protein-Ebene nicht nachgewiesen werden konnte, lässt sich eventuell durch die Desensibilisierung und Internalisierung dieser Rezeptoren erklären. Über diese regulatorischen Mechanismen verhindern Gq-gekoppelte Rezeptoren in ständiger Gegenwart ihrer Substrate die Hyperaktivierung der von ihnen induzierten Signalwege. Dem im physiologisch

hypertrophierten Myokard vermehrt exprimierten A<sub>2a</sub>-Rezeptor kommen unter physiologischen Bedingungen vor allem bedeutende Aufgaben bei der Regulation des Energiehaushalts zu. Zu seinen Aufgaben zählen die Vasodilatation, die Angiogenese, die Vaskulogenese und die Modulation adrenerger Signaltransduktion (Headrick et al., 2011). Des Weiteren aktiviert der Gas-gekoppelte Rezeptor die Adenylatcyclase und vermittelt darüber cAMP- und PKA-abhängig die vermehrte Calcium-Freisetzung aus dem SR, was wiederum die kardiale Kontraktilität steigert. Die beobachtete Zunahme des Adenosin-A<sub>2a</sub>-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene könnte folglich mit der gesteigerten Kontraktilität und der erhöhten Kapillardichte, die in physiologisch hypertrophierten Athleten beobachtet wird (Duncker und Bache, 2008; Laughlin et al., 2012), in Zusammenhang stehen. Somit könnten die Resultate der vorliegenden Arbeit erstmals auf einen Adenosin-vermittelten molekularen Mechanismus hinweisen, über den Ausdauersport die kardiale Funktion verbessert. Verantwortlich für die ausgeprägte Expression der Adenosinrezeptoren im physiologisch hypertrophierten Herzen könnte die bereits beschriebene durch Ausdauertraining induzierte Aktivitätssteigerung der 5'-Nukleotidase, dem Hauptregulator des Adenosin-Metabolismus, sein (Langfort et al., 1996). So spekulierten Pang und Kollegen, dass die Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems in Folge  $\alpha$ -adrenerger Stimulation zumindest teilweise durch die PE-bedingte Expressionszunahme der 5'Ectonukleotidase (CD73) und die durch deren Aktivität gesteigerte Adenosinproduktion hervorgerufen wird (Pang et al., 2010a).

Die hier durchgeführten Expressionsanalysen zeigten jedoch, dass die durch das Lauftraining ausgelöste Zunahme der Protein-Expression des A<sub>2a</sub>-Rezeptors und der mRNA-Expression aller Rezeptor-Subtypen durch Induktion des Myokardinfarktes aufgehoben wurde. Des Weiteren lieferten die experimentellen Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass Transkriptionsstatus oder Proteinexpressionsmuster der verschiedenen Rezeptoren in trainierten Mäusen nach Infarkt im Vergleich zu untrainierten Mäusen nach Infarkt erhöht waren. Somit konnte die Hypothese, dass Ausdauersport-vermittelte Kardioprotektion in Folge eines Myokardinfarktes eine Heraufregulation des Adenosinrezeptor-Systems involviert, nicht bestätigt werden. Die experimentellen Ergebnisse dieses Teilprojekts weisen jedoch darauf hin, dass die durch Ausdauertraining induzierte adaptive physiologische Hypertrophie mit einer Heraufregulation des Adenosin-Systems assoziiert ist. Die Induktion der pathologischen Hypertrophie hingegen, ausgelöst durch permanente LAD-Ligatur, führt zur

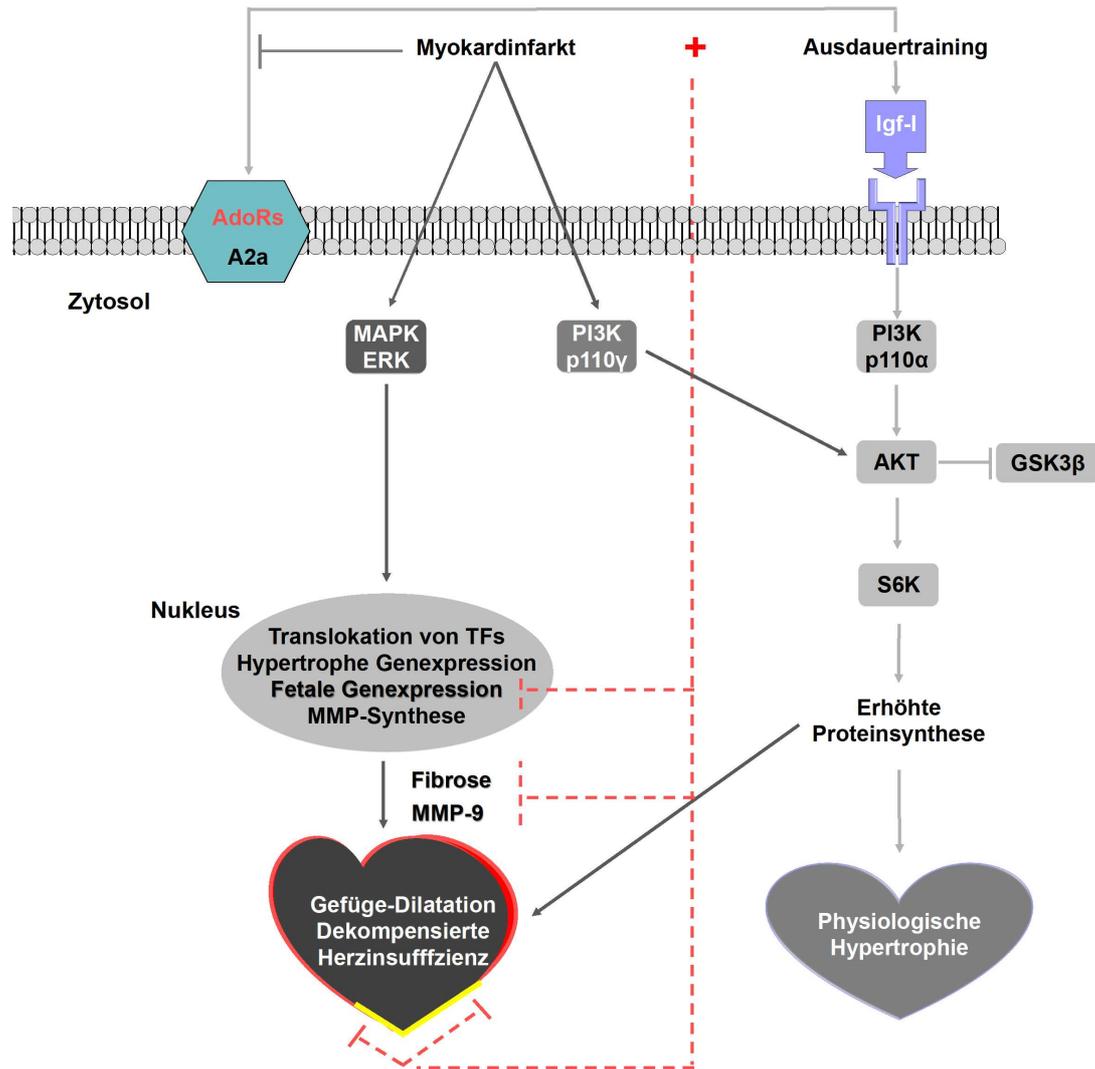
Aufhebung dieses Effekts. Gepaart mit der Beobachtung des ersten Teilprojekts, dass eine  $\alpha$ -adrenerg induzierte Hypertrophie, die weder durch kardiale Dysfunktion, noch durch ventrikuläre Dilatation charakterisiert war, mit einer Heraufregulation der Adenosinrezeptoren assoziiert ist (Abb. 23), weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass das Adenosinsystem an der Aufrechterhaltung einer kompensierten Hypertrophie beteiligt sein könnte. Hingegen könnten beim Übergang in die dekompenzierte Hypertrophie die durch Adenosin vermittelten kompensatorischen Mechanismen erschöpft sein und seine Rezeptoren herab reguliert werden. Diese Vermutung wird z. B. von Perlini und Kollegen gestützt, die beobachteten, dass der Adenosin-A1-Rezeptor in Ratten mit kompensierter Hypertrophie eine Heraufregulation auf mRNA- und Proteinebene erfährt, während der Übergang in die dekompenzierte Hypertrophie von einer Herabregulation des Rezeptors begleitet ist (Perlini et al., 2007).

### **5.2.5 Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 2**

Die Ergebnisse dieses Teilprojekts demonstrierten, dass freiwilliges Lauftraining vor und nach Myokardinfarkt keinen Effekt auf das Ausmaß adaptiver Hypertrophie-Marker, wie der Kardiomyozyten-Hypertrophie und der Vergrößerung linksventrikulärer Kavitäten, oder auf die kardiale Funktion ausübte, jedoch auch keine schädigende Wirkung nach sich zog. Da die adaptive Hypertrophie infolge physiologischer Stimulation mit günstigen Effekten assoziiert ist, scheint auch vielmehr eine gezielte Aktivierung dieser kompensatorischen Umbauvorgänge als deren Hemmung prognostisch erstrebenswert. Kontinuierliches freiwilliges Lauftraining resultierte im Versuch in der Protektion vor dem maladaptiven Remodeling durch Eindämmung der Infarktexpansion, der transmuralen Narbenausdünnung und der Fibrose im nicht-infarzierten Bereich, anscheinend über Hemmung der TNF $\alpha$ -Expression und tendenziell über Abschwächung der MMP-9-Aktivierung. Ob diese positiven Effekte die Konsequenz körperlicher Aktivität vor oder nach der Koronarokklusion reflektieren oder, ob die Limitation der Infarktausbreitung und der fibrotischen Antwort im nicht-infarzierten linken Ventrikel das Resultat der körperlichen Betätigung vor und nach Infarktinduktion darstellen, müssen weitere Arbeiten klären. Die Beobachtung könnte jedoch auf günstige längerfristige Auswirkungen des früh nach Infarkt initiierten Ausdauertrainings auf die ventrikuläre Steifigkeit und folglich auf die Pumpfunktion hinweisen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die körperliche Aktivität zu einer schwächeren infarktbedingten Reaktivierung fetaler Gene, welche

die kardiale Kontraktilität negativ beeinflussen, führte und eine Verschiebung des MHC-Expressionsverhältnisses in Richtung des adulten kontraktiven Myosinfilaments  $\alpha$ -MHC induzierte. Demnach unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Einsatz dieser günstigen und effektiven Therapieform, um kardioprotektive Mechanismen in Gang zu setzen. Es lässt sich spekulieren, dass die prognostisch günstigen Effekte des Ausdauertrainings durch eine längere Dauer der Trainingsperiode (nach Infarkt) gesteigert werden können.

Die durchgeführten Expressions-Analysen der Komponenten des adaptiven PI3K-Signalwegs lieferten keine evidenten Hinweise auf divergierende Signaltransduktionen zur Induktion der physiologischen oder der pathologischen Hypertrophie in physisch aktiven und physisch inaktiven Mäusen. Der Aktivitätsstatus der MAP-Kinase ERK scheint jedoch die physiologische von der pathologischen Hypertrophie zu unterscheiden. Die Kinase könnte also folglich ein therapeutisches Ziel zur Aufrechterhaltung adaptiver Mechanismen und zur Eindämmung maladaptiver Signaltransduktion darstellen. Die Beobachtung, dass die Infarktinduktion in körperlich aktiven Mäusen zur Herabregulation des Adenosinsystems auf mRNA-Ebene und des A<sub>2a</sub>-Subtyps auf Proteinebene führte, könnte erneut darauf hinweisen, dass Adenosin-aktivierte Rezeptoren anscheinend mit der Aufrechterhaltung der kompensierten Hypertrophie assoziiert sind, sei es die adaptive physiologische Variante, die eine gesteigerte kardiale Funktion involviert oder, wie im Teilprojekt 1 demonstriert, die kompensatorische Antwort in Folge maladaptiver  $\alpha$ -adrenerger Stimulation. So scheint es vom klinischen Standpunkt erstrebenswert das Adenosinsystem vermehrt zu aktivieren, etwa durch länger währende Trainingsperioden vor dem Auftreten eines Myokardinfarktes, um den Übergang zur Herzinsuffizienz zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Abb. 58 zeigt eine schematische Zusammenfassung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 2.



**Abb. 59: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen aus Teilprojekt 2**

Freiwilliges Lauftraining führte über Aktivierung des PI3Kp110 $\alpha$ /AKT/P70S6K-Signalwegs und Hemmung des anti-hypertrophen Faktors GSK3 $\beta$  zur Ausprägung der physiologischen Hypertrophie, vermutlich über Bindung des durch Ausdauertraining vermehrt sezernierten Igf-I an seine Rezeptortyrosinkinase. Die Heraufregulation des Adenosin-A2a-Rezeptors im physiologisch hypertrophen Phänotyp, die durch Induktion des anterolateralen Myokardinfarktes inhibiert wurde, weist erneut auf eine Beteiligung des Adenosin-Systems an der Aufrechterhaltung des kompensierten Zustandes des hypertrophierten Herzens hin. Die Kombination aus chronischer Druck- und Volumenbelastung, als Folge des Myokardinfarktes, führte, unabhängig vom Aktivitätsstatus der Versuchstiere, zur Aktivierung der MAPK ERK und von AKT. Kontinuierliches Lauftraining im Vorfeld und nach Myokardinfarkt schwächte die infarktinduzierte Reaktivierung fetaler Gene ab, hemmte fibrotische Prozesse, die Narbenausdünnung und dämmte die Infarktexpansion ein, vermutlich über Abschwächung der MMP-9-Aktivierung. Dies weist auf positive Effekte von Ausdauertraining auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt hin. Igf-I=Insulin-like growth factor I, PI3K=Phosphatidylinositol-3 Kinase, S6K=Ribosomale S6 Kinase, GSK3 $\beta$ =Glycogensynthasekinase 3  $\beta$ , AdoR=Adenosinrezeptor, MAPK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ERK=Extrazellulär regulierte Kinase, TFs=Transkriptionsfaktoren, MMP-9=Matrixmetalloproteinase 9

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alhaddad, I.A., Hakim, I., Siddiqi, F., Lagenback, E., Mallavarapu, C., Nethala, V., Mounce, D., Ross, P.L., Brown, E.J., Jr. (1998). Early exercise after experimental myocardial infarction: effect on left ventricular remodeling. *Coronary artery disease* 9: 319-327.
2. Anker, S.D., von Haehling, S. (2004). Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 90: 464-470.
3. Asakura, M., Asanuma, H., Kim, J., Liao, Y., Nakamaru, K., Fujita, M., Komamura, K., Isomura, T., Furukawa, H., Tomoike, H., Kitakaze, M. (2007). Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 30: 781-787.
4. Ashton, K.J., Nilsson, U., Willems, L., Holmgren, K., Headrick, J.P. (2003). Effects of aging and ischemia on adenosine receptor transcription in mouse myocardium. *Biochemical and biophysical research communications* 312: 367-372.
5. Avkiran, M., Yokoyama, H. (2000). Adenosine A(1) receptor stimulation inhibits alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac sarcolemmal Na(+)/H(+) exchanger. *British journal of pharmacology* 131: 659-662.
6. Babu, G.J., Lalli, M.J., Sussman, M.A., Sadoshima, J., Periasamy, M. (2000). Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32: 1447-1457.
7. Baines, C.P., Molkentin, J.D. (2005). STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38: 47-62.
8. Balakumar, P., Singh, M. (2006). Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in heart failure: future directions. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 99: 391-397.
9. Balakumar, P., Jagadeesh, G. (2010). Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 62: 365-383.
10. Banfi, C., Cavalca, V., Veglia, F., Brioschi, M., Barcella, S., Mussoni, L., Boccotti, L., Tremoli, E., Biglioli, P., Agostoni, P. (2005). Neurohormonal activation is associated with increased levels of plasma matrix metalloproteinase-2 in human heart failure. *European heart journal* 26, 481-488.
11. Beisvag, V., Kemi, O.J., Arbo, I., Loennechen, J.P., Wisloff, U., Langaas, M., Sandvik, A.K., Ellingsen, O. (2009). Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 16, 690-697.
12. Blackburn, M.R., Vance, C.O., Morschl, E., Wilson, C.N. (2009). Adenosine receptors and inflammation. *Handbook of experimental pharmacology*, 215-269.

13. Bozkurt, B., Kribbs, S.B., Clubb, F.J., Jr., Michael, L.H., Didenko, V.V., Hornsby, P.J., Seta, Y., Oral, H., Spinale, F.G., Mann, D.L. (1998). Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97: 1382-1391.
14. Bradham, W.S., Bozkurt, B., Gunasinghe, H., Mann, D., Spinale, F.G. (2002). Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective. *Cardiovascular research* 53: 822-830.
15. Brower, G.L., Gardner, J.D., Forman, M.F., Murray, D.B., Voloshenyuk, T., Levick, S.P., Janicki, J.S. (2006). The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 30: 604-610.
16. Brown, D.A., Chicco, A.J., Jew, K.N., Johnson, M.S., Lynch, J.M., Watson, P.A., Moore, R.L. (2005). Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *The Journal of physiology* 569: 913-924.
17. Bryant, D., Becker, L., Richardson, J., Shelton, J., Franco, F., Peshock, R., Thompson, M., Giroir, B. (1998). Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 97: 1375-1381.
18. Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., Kitsis, R.N., Molkentin, J.D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* 19: 6341-6350.
19. Cai, J., Yi, F.F., Bian, Z.Y., Shen, D.F., Yang, L., Yan, L., Tang, Q.Z., Yang, X.C., Li, H. (2009). Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1/2 signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* 13: 909-925.
20. Carreno, J.E., Apablaza, F., Ocaranza, M.P., Jalil, J.E. (2006). [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Revista espanola de cardiologia* 59: 473-486.
21. Chen, H., Koupenova, M., Yang, D., Sume, S.S., Trackman, P.C., Ravid, K. (2011). Regulation of MMP-9 expression by the A2b adenosine receptor and its dependency on TNF-alpha signaling. *Experimental hematology* 39: 525-530.
22. Chen, X., Zhang, X., Kubo, H., Harris, D.M., Mills, G.D., Moyer, J., Berretta, R., Potts, S.T., Marsh, J.D., Houser, S.R. (2005). Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circulation research* 97: 1009-1017.
23. Chen, Y., Epperson, S., Makhsudova, L., Ito, B., Suarez, J., Dillmann, W., Villarreal, F. (2004). Functional effects of enhancing or silencing adenosine A2b receptors in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287: H2478-2486.
24. Cheng, W., Li, B., Kajstura, J., Li, P., Wolin, M.S., Sonnenblick, E.H., Hintze, T.H., Olivetti, G., Anversa, P. (1995). Stretch-induced programmed myocyte cell death. *The Journal of clinical investigation* 96: 2247-2259.
25. Chung, E.S., Perlini, S., Aurigemma, G.P., Fenton, R.A., Dobson, J.G., Jr., Meyer, T.E. (1998). Effects of chronic adenosine uptake blockade on adrenergic responsiveness and left ventricular chamber function in pressure overload hypertrophy in the rat. *Journal of hypertension* 16: 1813-1822.

26. Cingolani, H.E., Villa-Abrille, M.C., Cornelli, M., Nolly, A., Ennis, I.L., Garciarena, C., Suburo, A.M., Torbidoni, V., Correa, M.V., Camilionde Hurtado, M.C., Aiello, E.A. (2006). The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension* 47: 727-734.
27. Cleutjens, J.P., Verluyten, M.J., Smiths, J.F., Daemen, M.J. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *The American journal of pathology* 147: 325-338.
28. Coats, A.J. (2000). Exercise training in heart failure. *Current controlled trials in cardiovascular medicine* 1: 155-160.
29. Communal, C., Singh, K., Pimentel, D.R., Colucci, W.S. (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 98: 1329-1334.
30. Creemers, E.E., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circulation research* 89: 201-210.
31. Creemers, E.E., Davis, J.N., Parkhurst, A.M., Leenders, P., Dowdy, K.B., Hapke, E., Hauet, A.M., Escobar, P.G., Cleutjens, J.P., Smits, J.F., Daemen, M.J., Zile, M.R., Spinale, F.G. (2003). Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 284: H364-371.
32. Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369: 418-420.
33. Dai, D.F., Johnson, S.C., Villarin, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W. 2nd, Kang, Y.J., Prolla, T.A., Santana, L.F., Rabinovitch, P.S. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circulation Research* 108: 837-846.
34. D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B., Dorn, G.W., 2nd (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 8121-8126.
35. Dayan, A., Feinberg, M.S., Holbova, R., Deshet, N., Scheinowitz, M. (2005). Swimming exercise training prior to acute myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats. *Annals of clinical and laboratory science* 35: 73-78.
36. De Waard, M.C., van der Velden, J., Bito, V., Ozdemir, S., Biesmans, L., Boontje, N.M., Dekkers, D.H., Schoonderwoerd, K., Schuurbijs, H.C., de Crom, R., Stienen, G.J., Sipido, K.R., Lamers, J.M., Duncker, D.J. (2007). Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circulation research* 100: 1079-1088.
37. DeBosch, B., Treskov, I., Lupu, T.S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Courtois, M., Muslin, A.J. (2006). Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 113: 2097-2104.
38. Delagardelle, C., Feiereisen, P., Autier, P., Shita, R., Krecke, R., and Beissel, J. (2002). Strength/endurance training versus endurance training in congestive heart failure. *Medicine and science in sports and exercise* 34: 1868-1872.
39. Dorn, G.W., 2nd, Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 115: 527-537.

40. Dubach, P., Myers, J., Dziekan, G., Goebbels, U., Reinhart, W., Muller, P., Buser, P., Stulz, P., Vogt, P., Ratti, R. (1997). Effect of high intensity exercise training on central hemodynamic responses to exercise in men with reduced left ventricular function. *Journal of the American College of Cardiology* 29: 1591-1598.
41. Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Jackson, E.K. (1999). Adenosine inhibits collagen and total protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 33: 190-194.
42. Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Zacharia, L.C., Mi, Z., Jackson, E.K. (2001). A<sub>2b</sub> receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 37: 716-721.
43. Duncker, D.J., Bache, R.J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological Reviews* 88:1009-1086.
44. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., Lohse, M.J. (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 7059-7064.
45. Epperson, S.A., Brunton, L.L., Ramirez-Sanchez, I., Villarreal, F. (2009). Adenosine receptors and second messenger signaling pathways in rat cardiac fibroblasts. *American journal of physiology Cell physiology* 296: C1171-1177.
46. Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y., Wagner, D.R. (2006). Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A<sub>2a</sub> receptor and cAMP/PKA/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Circulation research* 99: 590-597.
47. Fassett, J.T., Hu, X., Xu, X., Lu, Z., Zhang, P., Chen, Y., Bache, R.J. (2011). Adenosine kinase regulation of cardiomyocyte hypertrophy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300, H1722-1732.
48. Flesch, M., Maack, C., Cremers, B., Baumer, A.T., Sudkamp, M., Boehm, M. (1999). Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* 100: 346-353.
49. Force, T., Michael, A., Kilter, H., Haq, S. (2002). Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. *Journal of cardiac failure* 8, S351-358.
50. Frey, N., Olson, E.N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual review of physiology* 65: 45-79.
51. Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., and Hill, J.A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109: 1580-1589.
52. Fretwell, L., Dickenson, J.M. (2011). Role of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in adenosine A receptor-mediated pharmacological postconditioning in H9c2 cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 89: 24-30.
53. Funakoshi, H., Chan, T.O., Good, J.C., Libonati, J.R., Piuholo, J., Chen, X., MacDonnell, S.M., Lee, L.L., Herrmann, D.E., Zhang, J., Feldman, A.M. (2006). Regulated overexpression of the A<sub>1</sub>-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function. *Circulation* 114: 2240-2250.
54. Funakoshi, H., Zacharia, L.C., Tang, Z., Zhang, J., Lee, L.L., Good, J.C., Herrmann, D.E., Higuchi, Y., Koch, W.J., Jackson, E.K., Chan, T.O., Feldman, A.M. (2007). A<sub>1</sub> adenosine receptor upregulation accompanies decreasing myocardial adenosine levels in mice with left ventricular dysfunction. *Circulation* 115: 2307-2315.

55. Funaya, H., Kitakaze, M., Node, K., Minamino, T., Komamura, K., Hori, M. (1997). Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 95: 1363-1365.
56. Gan, X.T., Rajapurohitam, V., Haist, J.V., Chidiac, P., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2005). Inhibition of phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy by activation of multiple adenosine receptor subtypes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 312: 27-34.
57. Gardner, J.D., Murray, D.B., Voloshenyuk, T.G., Brower, G.L., Bradley, J.M., Janicki, J.S. (2010). Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H497-504.
58. Gaudron, P., Hu, K., Schamberger, R., Budin, M., Walter, B., Ertl, G. (1994). Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation* 89: 402-412.
59. Germack, R., Dickenson, J.M. (2004). Characterization of ERK1/2 signalling pathways induced by adenosine receptor subtypes in newborn rat cardiomyocytes. *British journal of pharmacology* 141: 329-339.
60. Giannuzzi, P., Tavazzi, L., Temporelli, P.L., Corra, U., Imparato, A., Gattone, M., Giordano, A., Sala, L., Schweiger, C., Malinverni, C. (1993). Long-term physical training and left ventricular remodeling after anterior myocardial infarction: results of the Exercise in Anterior Myocardial Infarction (EAMI) trial. EAMI Study Group. *Journal of the American College of Cardiology* 22: 1821-1829.
61. Giannuzzi, P., Temporelli, P.L., Corra, U., Gattone, M., Giordano, A., Tavazzi, L. (1997). Attenuation of unfavorable remodeling by exercise training in postinfarction patients with left ventricular dysfunction: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction (ELVD) trial. *Circulation* 96: 1790-1797.
62. Giannuzzi, P., Temporelli, P.L., Corra, U., Tavazzi, L., Group, E.-C.S. (2003). Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction and Chronic Heart Failure (ELVD-CHF) Trial. *Circulation* 108: 554-559.
63. Gillespie-Brown, J., Fuller, S.J., Bogoyevitch, M.A., Cowley, S., Sugden, P.H. (1995). The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 270: 28092-28096.
64. Giordano, F.J. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of clinical investigation* 115: 500-508.
65. Glennon, P.E., Kaddoura, S., Sale, E.M., Sale, G.J., Fuller, S.J., Sugden, P.H. (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circulation research* 78: 954-961.
66. Gunasinghe, S.K., Ikonomidis, J., Spinale, F.G. (2001). Contributory role of matrix metalloproteinases in cardiovascular remodeling. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders* 1: 75-91.
67. Hahn, H.S., Marreez, Y., Odley, A., Sterbling, A., Yussman, M.G., Hilty, K.C., Bodi, I., Liggett, S.B., Schwartz, A., Dorn, G.W., 2nd (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circulation research* 93: 1111-1119.

- 
68. Hambrecht, R., Fiehn, E., Yu, J., Niebauer, J., Weigl, C., Hilbrich, L., Adams, V., Riede, U., Schuler, G. (1997). Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 29: 1067-1073.
  69. Hambrecht, R., Gielen, S., Linke, A., Fiehn, E., Yu, J., Walther, C., Schoene, N., Schuler, G. (2000). Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 283: 3095-3101.
  70. Haq, S., Choukroun, G., Kang, Z.B., Ranu, H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Molkentin, J.D., Alessandrini, A., Woodgett, J., Hajjar, R., Michael, A., Force, T. (2000). Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of cell biology* 151: 117-130.
  71. Haykowsky, M., Scott, J., Esch, B., Schopflocher, D., Myers, J., Paterson, I., Warburton, D., Jones, L., Clark, A.M. (2011). A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. *Trials* 12: 92.
  72. Headrick, J.P., Peart, J.N., Reichelt, M.E., Haseler, L.J. (2011). Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochimica et biophysica acta* 1808: 1413-1428.
  73. Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schonburg, M., Elsasser, A., Polyakova, V., Bauer, E.P., Klovekorn, W.P., Schaper, J. (2003). Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107: 984-991.
  74. Held, C., Iqbal, R., Lear, S.A., Rosengren, A., Islam, S., Mathew, J., Yusuf, S. (2012). Physical activity levels, ownership of goods promoting sedentary behaviour and risk of myocardial infarction: results of the INTERHEART study. *European heart journal* 33: 452-466.
  75. Henriksen, P.A., Newby, D.E. (2003). Therapeutic inhibition of tumour necrosis factor alpha in patients with heart failure: cooling an inflamed heart. *Heart* 89: 14-18.
  76. Hoque, N., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2000). Inhibition of alpha(1)-adrenergic-mediated responses in rat ventricular myocytes by adenosine A(1) receptor activation: role of the K(ATP) channel. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 294: 770-777.
  77. Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Utsumi, H., Kang, D., Hattori, N., Uchida, K., Arimura, K., Egashira, K., Takeshita, A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation research* 85: 357-363.
  78. Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Kasuya, Y., Miyauchi, T. (2006). Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. *Journal of Applied Physiology* 101(1):151-163.
  79. Ikeuchi, M., Tsutsui, H., Shiomi, T., Matsusaka, H., Matsushima, S., Wen, J., Kubota, T., Takeshita, A. (2004). Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovascular research* 64: 526-535.

80. Inagaki, K., Iwanaga, Y., Sarai, N., Onozawa, Y., Takenaka, H., Mochly-Rosen, D., Kihara, Y. (2002). Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34: 1377-1385.
81. Jayasankar, V., Woo, Y.J., Bish, L.T., Pirolli, T.J., Berry, M.F., Burdick, J., Bhalla, R.C., Sharma, R.V., Gardner, T.J., Sweeney, H.L. (2004). Inhibition of matrix metalloproteinase activity by TIMP-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 110: II180-186.
82. Jenner, T.L., Mellick, A.S., Harrison, G.J., Griffiths, L.R., Rose'Meyer, R.B. (2004). Age-related changes in cardiac adenosine receptor expression. *Mechanisms of ageing and development* 125: 211-217
83. Karmazyn, M., Sostaric, J.V., Gan, X.T. (2001). The myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs* 61: 375-389.
84. Keith, M., Geranmayegan, A., Sole, M.J., Kurian, R., Robinson, A., Omran, A.S., Jeejeebhoy, K.N. (1998). Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 31: 1352-1356.
85. Kiilavuori, K., Toivonen, L., Naveri, H., Leinonen, H. (1995). Reversal of autonomic derangements by physical training in chronic heart failure assessed by heart rate variability. *European heart journal* 16: 490-495.
86. Kim, C., Kim, D.Y., and Lee, D.W. (2011). The impact of early regular cardiac rehabilitation program on myocardial function after acute myocardial infarction. *Annals of rehabilitation medicine* 35: 535-540.
87. Kimura, S., Zhang, G.X., Nishiyama, A., Shokoji, T., Yao, L., Fan, Y.Y., Rahman, M., Abe, Y. (2005a). Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 45: 438-444.
88. Kimura, S., Zhang, G.X., Nishiyama, A., Shokoji, T., Yao, L., Fan, Y.Y., Rahman, M., Suzuki, T., Maeta, H., Abe, Y. (2005b). Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension* 45:860-866.
89. Kitakaze, M., Minamino, T., Node, K., Koretsune, Y., Komamura, K., Funaya, H., Kuzuya, T., Hori, M. (1998). Elevation of plasma adenosine levels may attenuate the severity of chronic heart failure. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 12: 307-309.
90. Kloner, R.A., Kloner, J.A. (1983). The effect of early exercise on myocardial infarct scar formation. *American heart journal* 106: 1009-1013.
91. Knowlton, K.U., Michel, M.C., Itani, M., Shubeita, H.E., Ishihara, K., Brown, J.H., Chien, K.R. (1993). The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 268: 15374-15380.
92. Koizumi, T., Miyazaki, A., Komiyama, N., Sun, K., Nakasato, T., Masuda, Y., Komuro, I. (2003). Improvement of left ventricular dysfunction during exercise by walking in patients with successful percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 67: 233-237.

93. Kubo, N., Ohmura, N., Nakada, I., Yasu, T., Katsuki, T., Fujii, M., Saito, M. (2004). Exercise at ventilatory threshold aggravates left ventricular remodeling in patients with extensive anterior acute myocardial infarction. *American heart journal* 147: 113-120.
94. Kubota, T., McTiernan, C.F., Frye, C.S., Slawson, S.E., Lemster, B.H., Koretsky, A.P., Demetris, A.J., Feldman, A.M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation research* 81: 627-635.
95. Kuster, G.M., Pimentel, D.R., Adachi, T., Ido, Y., Brenner, D.A., Cohen, R.A., Liao, R., Siwik, D.A., Colucci, W.S. (2005). Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras. *Circulation* 111: 1192-1198.
96. Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Takeya, M., Takeshita, A., Egashira, K., Imaizumi, T. (2004). Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* 43: 739-745.
97. Langfort, J., Czarnowski, D., Pilis, W., Wojcik, B., Gorski, J. (1996). Effect of various types of exercise training on 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities in rat heart: influence of a single bout of endurance exercise. *Biochemical and molecular medicine* 59: 28-32.
98. Larsen, A.I., Aukrust, P., Aarsland, T., Dickstein, K. (2001). Effect of aerobic exercise training on plasma levels of tumor necrosis factor alpha in patients with heart failure. *The American journal of cardiology* 88: 805-808.
99. Latronico, M.V., Costinean, S., Lavitrano, M.L., Peschle, C., Condorelli, G. (2004). Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015: 250-260.
100. Laughlin, M.H., Bowles, D.K., Duncker, D.J. (2012). The coronary circulation in exercise training. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 302:H10-23
101. Liao, Y., Takashima, S., Asano, Y., Asakura, M., Ogai, A., Shintani, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogita, H., Tomoike, H., Hori, M., Kitakaze M., (2003). Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circulation research* 93: 759-766
102. Liao, Y., Lin, L., Lu, D., Fu, Y., Bin, J., Xu, D., Kitakaze, M. (2011). Activation of adenosine A1 receptor attenuates tumor necrosis factor-alpha induced hypertrophy of cardiomyocytes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 65: 491-495.
103. Libonati, J.R. (2003). Exercise and diastolic function after myocardial infarction. *Medicine and science in sports and exercise* 35: 1471-1476.
104. Linden, J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41: 775-787.
105. Liu, J.L., Irvine, S., Reid, I.A., Patel, K.P., Zucker, I.H. (2000). Chronic exercise reduces sympathetic nerve activity in rabbits with pacing-induced heart failure: A role for angiotensin II. *Circulation* 102: 1854-1862.
106. Lymperopoulos, A., Rengo, G., Funakoshi, H., Eckhart, A.D., Koch, W.J. (2007). Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nature medicine* 13: 315-323.

107. Maack, C., Kartes, T., Kilter, H., Schafers, H.J., Nickenig, G., Bohm, M., Laufs, U. (2003). Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108: 1567-1574.
108. Maack, C., Ganesan, A., Sidor, A., O'Rourke, B. (2005). Cardiac sodium-calcium exchanger is regulated by allosteric calcium and exchanger inhibitory peptide at distinct sites. *Circulation research* 96: 91-99.
109. Maack, C. (2012). Dissecting the role of g-protein-coupled receptor kinase 2 for excitation-contraction coupling. *Circulation* 125: 2054-2056.
110. Mahaffey, K.W., Puma, J.A., Barbagelata, N.A., DiCarli, M.F., Leeser, M.A., Browne, K.F., Eisenberg, P.R., Bolli, R., Casas, A.C., Molina-Viamonte, V., *et al.* (1999). Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 34: 1711-1720.
111. Mallat, Z., Philip, I., Lebre, M., Chatel, D., Maclouf, J., Tedgui, A. (1998). Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97: 1536-1539.
112. Mann, D.L. (2003). Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annual review of physiology* 65: 81-101.
113. McIntosh, V.J., Lasley, R.D. (2012). Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 17: 21-33.
114. McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 12355-12360.
115. McMullen, J.R., Sherwood, M.C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A.L., Shioi, T., Izumo, S. (2004a). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* 109: 3050-3055.
116. McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Dorfman, A.L., Longnus, S., Pende, M., Martin, K.A., Blenis, J., Thomas, G., Izumo, S. (2004b). Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biology* 24, 6231-6240.
117. McMullen, J.R., Jennings, G.L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34: 255-262.
118. Molken, J.D., Dorn, G.W., 2nd (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology* 63, 391-426.
119. Moore, R.L., Korzick, D.H. (1995). Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. *Progress in cardiovascular diseases* 37: 371-396.
120. Morganroth, J., Maron, B.J., Henry, W.L., Epstein, S.E. (1975). Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Annals of internal medicine* 82: 521-524.

121. Mott, J.D., Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology* 16: 558-564.
122. Mraiche, F., Oka, T., Gan, X.T., Karmazyn, M., Fliegel, L. (2011). Activated NHE1 is required to induce early cardiac hypertrophy in mice. *Basic research in cardiology* 106: 603-616.
123. Mukherjee, R., Brinsa, T.A., Dowdy, K.B., Scott, A.A., Baskin, J.M., Deschamps, A.M., Lowry, A.S., Escobar, G.P., Lucas, D.G., Yarbrough, W.M., Zile, M.R., Spinale, F.G. (2003). Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 107: 618-625.
124. Narayan, P., Mentzer, R.M., Jr., Lasley, R.D. (2001). Adenosine A1 receptor activation reduces reactive oxygen species and attenuates stunning in ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33: 121-129.
125. Newman, W.H., Grossman, S.J., Frankis, M.B., Webb, J.G. (1984). Increased myocardial adenosine release in heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 16: 577-580.
126. Olson, E.R., Naugle, J.E., Zhang, X., Bomser, J.A., Meszaros, J.G. (2005). Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288: H1131-1138.
127. Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., Sasayama, S. (1998). Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98: 149-156.
128. Opie, L.H., Commerford, P.J., Gersh, B.J., Pfeffer, M.A. (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 367: 356-367.
129. Orenstein, T.L., Parker, T.G., Butany, J.W., Goodman, J.M., Dawood, F., Wen, W.H., Wee, L., Martino, T., McLaughlin, P.R., Liu, P.P. (1995). Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. *The Journal of clinical investigation* 96: 858-866.
130. Otsuka, Y., Takaki, H., Okano, Y., Satoh, T., Aihara, N., Matsumoto, T., Yasumura, Y., Morii, I., Goto, Y. (2003). Exercise training without ventricular remodeling in patients with moderate to severe left ventricular dysfunction early after acute myocardial infarction. *International journal of cardiology* 87: 237-244.
131. Pang, T., Gan, X.T., Freeman, D.J., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2010a). Compensatory upregulation of the adenosine system following phenylephrine-induced hypertrophy in cultured rat ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H545-553.
132. Pang, T., Rajapurohitam, V., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2010b). Differential AMPK phosphorylation sites associated with phenylephrine vs. antihypertrophic effects of adenosine agonists in neonatal rat ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H1382-1390.
133. Peng, H., Carretero, O.A., Vuljaj, N., Liao, T.D., Motivala, A., Peterson, E.L., Rhaleb, N.E. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation* 112: 2436-2445.

134. Perlini, S., Arosio, B., Parmeggiani, L., Santambrogio, D., Palladini, G., Tozzi, R., Gatti, C., Annoni, G., Meyer, T.E., Ferrari, A.U. (2007). Adenosine A1 receptor expression during the transition from compensated pressure overload hypertrophy to heart failure. *Journal of hypertension* 25: 449-454.
135. Pliquett, R.U., Cornish, K.G., Patel, K.P., Schultz, H.D., Peuler, J.D., Zucker, I.H. (2003). Amelioration of depressed cardiopulmonary reflex control of sympathetic nerve activity by short-term exercise training in male rabbits with heart failure. *Journal of applied physiology* 95: 1883-1888.
136. Raake, P.W., Zhang, X., Vinge, L.E., Brinks, H., Gao, E., Jaleel, N., Li, Y., Tang, M., Most, P., Dorn, G.W. 2nd, Houser, S.R., Katus, H.A., Chen, X., Koch, W.J. (2012). Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca<sup>2+</sup> handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 125: 2108-2118
137. Reiken, S., Wehrens, X.H., Vest, J.A., Barbone, A., Klotz, S., Mancini, D., Burkhoff, D., Marks, A.R. (2003). Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* 107: 2459-2466.
138. Rengo, G., Leosco, D., Zincarelli, C., Marchese, M., Corbi, G., Liccardo, D., Filippelli, A., Ferrara, N., Lisanti, M.P., Koch, W.J., Lymperopoulos, A. (2010). Adrenal GRK2 lowering is an underlying mechanism for the beneficial sympathetic effects of exercise training in heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H2032-2038.
139. Rohde, L.E., Ducharme, A., Arroyo, L.H., Aikawa, M., Sukhova, G.H., Lopez-Anaya, A., McClure, K.F., Mitchell, P.G., Libby, P., Lee, R.T. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 99: 3063-3070.
140. Rongen, G.A., Lenders, J.W., Lambrou, J., Willemsen, J.J., Van Belle, H., Thien, T., Smits, P. (1996). Presynaptic inhibition of norepinephrine release from sympathetic nerve endings by endogenous adenosine. *Hypertension* 27: 933-938.
141. Ruwhof, C., van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular research* 47: 23-37.
142. Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H.S., Izumo, S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977-984.
143. Sakata, Y., Hoit, B.D., Liggett, S.B., Walsh, R.A., Dorn, G.W., 2nd (1998). Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation* 97: 1488-1495.
144. Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., Colucci, W.S. (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34: 379-388.
145. Shen, D.F., Tang, Q.Z., Yan, L., Zhang, Y., Zhu, L.H., Wang, L., Liu, C., Bian, Z.Y., Li, H. (2010). Tetrandrine blocks cardiac hypertrophy by disrupting reactive oxygen species-dependent ERK1/2 signalling. *British journal of pharmacology* 159: 970-981.
146. Shephard, R.J., Balady, G.J. (1999). Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 99, 963-972.
147. Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M., Lawitts, J., Cantley, L.C., Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *The EMBO journal* 19: 2537-2548.

148. Shubeita, H.E., McDonough, P.M., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Glembotski, C.C., Brown, J.H., Chien, K.R. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 265: 20555-20562.
149. Simonis, G., Wiedemann, S., Joachim, D., Weinbrenner, C., Marquetant, R., Strasser, R.H. (2009). Stimulation of adenosine A2b receptors blocks apoptosis in the non-infarcted myocardium even when administered after the onset of infarction. *Molecular and cellular biochemistry* 328: 119-126.
150. Siwik, D.A., Chang, D.L., Colucci, W.S. (2000). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circulation research* 86: 1259-1265.
151. Snyder, D.L., Wang, W., Pelleg, A., Friedman, E., Horwitz, J., Roberts, J. (1998). Effect of aging on A1-adenosine receptor-mediated inhibition of norepinephrine release in the rat heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 31: 352-358.
152. Spinale, F.G., Coker, M.L., Thomas, C.V., Walker, J.D., Mukherjee, R., Hebbbar, L. (1998). Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circulation research* 82: 482-495.
153. Spinale, F.G. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiological reviews* 87: 1285-1342.
154. Sriramula, S., Haque, M., Majid, D.S., Francis, J. (2008). Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension* 51: 1345-1351.
155. Stowe, D.F., O'Brien, W.C., Chang, D., Knop, C.S., Kampine, J.P. (1997). Reversal of endothelin-induced vasoconstriction by endothelium-dependent and -independent vasodilators in isolated hearts and vascular rings. *Journal of cardiovascular pharmacology* 29: 747-754.
156. Sugden, P.H. (2001). Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Annals of medicine* 33: 611-622.
157. Sundstrom, J., Evans, J.C., Benjamin, E.J., Levy, D., Larson, M.G., Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Colucci, W.S., Sutherland, P., Wilson, P.W., Vasan, R.S. (2004). Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation* 109: 2850-2856.
158. Sutra, T., Oiry, C., Azay-Milhau, J., Youl, E., Magous, R., Teissedre, P.L., Cristol, J.P., Cros, G. (2008). Preventive effects of nutritional doses of polyphenolic molecules on cardiac fibrosis associated with metabolic syndrome: involvement of osteopontin and oxidative stress. *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 11683-11687.
159. Taddei, S., Arzilli, F., Arrighi, P., Salvetti, A. (1992). Dipyridamole decreases circulating renin-angiotensin system activity in hypertensive patients. *American journal of hypertension* 5: 29-31.
160. Tang, X.Y., Hong, H.S., Chen, L.L., Lin, X.H., Lin, J.H., and Lin, Z. (2011). Effects of exercise of different intensities on the angiogenesis, infarct healing, and function of the left ventricle in postmyocardial infarction rats. *Coronary artery disease* 22: 497-506.

161. Thorburn, J., Frost, J.A., Thorburn, A. (1994a). Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *The Journal of cell biology* 126: 1565-1572.
162. Thorburn, J., McMahon, M., Thorburn, A. (1994b). Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 269: 30580-30586.
163. Usui, S., Yeh, I., Tian, B., Sadoshima, J. (2006). Global changes in gene expression during cardiac hypertrophy: a new direction of cardiac signaling research. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41: 219-222.
164. Veiga, E.C., Antonio, E.L., Bocalini, D.S., Murad, N., Abreu, L.C., Tucci, P.J., and Sato, M.A. (2011). Prior exercise training does not prevent acute cardiac alterations after myocardial infarction in female rats. *Clinics* 66: 889-893.
165. Villarreal, F., Epperson, S.A., Ramirez-Sanchez, I., Yamazaki, K.G., Brunton, L.L. (2009). Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: roles for Epac and PI3K. *American journal of physiology Cell physiology* 296: C1178-1184.
166. von Harsdorf, R., Li, P.F., Dietz, R. (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99: 2934-2941.
167. Wagner, D.R., Combes, A., McTiernan, C., Sanders, V.J., Lemster, B., Feldman, A.M. (1998). Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation research* 82: 47-56.
168. Wagner, D.R., Kubota, T., Sanders, V.J., McTiernan, C.F., and Feldman, A.M. (1999). Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *The American journal of physiology* 276: H2141-2147.
169. Wagner, D.R., Delagardelle, C., Ernens, I., Rouy, D., Vaillant, M., Beissel, J. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *Journal of cardiac failure* 12: 66-72.
170. Wakeno, M., Minamino, T., Seguchi, O., Okazaki, H., Tsukamoto, O., Okada, K., Hirata, A., Fujita, M., Asanuma, H., Kim, J., Kitakaze, M. (2006). Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* 114: 1923-1932.
171. Walsh, K. (2006). Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* 113: 2032-2034.
172. Wang, M., Zhang, J., Walker, S.J., Dworakowski, R., Lakatta, E.G., Shah, A.M. (2010). Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling. *Journal of molecular und cellular cardiology* 48: 765-772.
173. Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H.M., Schluter, K.D. (2001). Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 2291-2293.
174. Wettschureck, N., Rutten, H., Zywietz, A., Gehring, D., Wilkie, T.M., Chen, J., Chien, K.R., Offermanns, S. (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphi1 in cardiomyocytes. *Nature medicine* 7: 1236-1240.

175. Williams-Pritchard, G., Knight, M., Hoe, L.S., Headrick, J.P., Peart, J.N. (2011). Essential role of EGFR in cardioprotection and signaling responses to A1 adenosine receptors and ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300: H2161-2168.
176. Wisloff, U., Loennechen, J.P., Currie, S., Smith, G.L., Ellingsen, O. (2002). Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity und SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 54: 162-174.
177. Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
178. Xia, Y., Rajapurohitam, V., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2004). Inhibition of phenylephrine induced hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes by the mitochondrial KATP channel opener diazoxide. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37: 1063-1067.
179. Xia, Y., Javadov, S., Gan, T.X., Pang, T., Cook, M.A., Karmazyn, M. (2007). Distinct KATP channels mediate the antihypertrophic effects of adenosine receptor activation in neonatal rat ventricular myocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320: 14-21.
180. Xiang, F., Huang, Y.S., Zhang, D.X., Chu, Z.G., Zhang, J.P., Zhang, Q. (2010). Adenosine A1 receptor activation reduces opening of mitochondrial permeability transition pores in hypoxic cardiomyocytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37: 343-349.
181. Xu, X., Fassett, J., Hu, X., Zhu, G., Lu, Z., Li, Y., Schnermann, J., Bache, R.J., Chen, Y. (2008). Ecto-5'-nucleotidase deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy und dysfunction. *Hypertension* 51: 1557-1564.
182. Xu, X., Wan, W., Powers, A.S., Li, J., Ji, L.L., Lao, S., Wilson, B., Erikson, J.M., Zhang, J.Q. (2008). Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 44: 114-122.
183. You Fang, Z., Marwick, T.H. (2003). Mechanisms of exercise training in patients with heart failure. *American heart journal* 145: 904-911.
184. Yengo, C.M., Zimmerman, S.D., McCormick, R.J., Thomas, D.P. (2012). Exercise Training post-MI Favorably Modifies Heart Extracellular Matrix in the Rat. *Medicine and science in sports und exercise*. Im Druck
185. Zhang, L.Q., Zhang, X.Q., Ng, Y.C., Rothblum, L.I., Musch, T.I., Moore, R.L., Cheung, J.Y. (2000). Sprint training normalizes Ca<sup>2+</sup> transients and SR function in postinfarction rat myocytes. *Journal of applied physiology* 89: 38-46.
186. Zhao, P., Li, X.G., Yang, M., Shao, Q., Wang, D., Liu, S., Song, H., Song, B., Zhang, Y., Qu, X. (2008). Hypoxia suppresses the production of MMP-9 by human monocyte-derived dendritic cells and requires activation of adenosine receptor A2b via cAMP/PKA signaling pathway. *Molecular immunology* 45: 2187-2195.
187. Zhu, W.Z., Wang, S.Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J.H., Devic, E., Kobilka, B.K., Cheng, H., Xiao, R.P. (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *The Journal of clinical investigation* 111: 617-625

## 7 Publikationen

### 7.1 Abstract-Publikationen

- 1) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, D. Wagner, M. Boehm, H. Kilter (2010). Adenosin A1-receptor inhibits phenylephrine induced hypertrophic response in cardiomyocytes. Abstract: (P1333) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2010
- 2) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, D.R. Wagner, M. Boehm, H. Kilter (2010). Adenosine inhibits phenylephrine but not angiotensin II or IGF-1 induced hypertrophic response in cardiomyocytes by activation of the adenosine A1-receptor. Abstract: (86262) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) in Stockholm 2010
- 3) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, C. Maack, D. R. Wagner, M. Boehm, H. Kilter (2011). Negative feedback on hypertrophic signaling by adenosine A1-receptor upregulation in response to  $\alpha$ 1-adrenergic, but not angiotensin II receptor stimulation in cardiac myocytes. Abstract: (V1089) Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2011
- 4) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, D.R. Wagner, K. Roemer, M. Boehm, C. Maack, H. Kilter (2011). Adenosine-A1-receptor upregulation counteracts cardiac hypertrophy in response to alpha1-adrenergic receptor stimulation. Abstract: (82381) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) in Paris 2011
- 5) **S.-L. Puhl**, A. Mueller, Y. Devaux, D.R. Wagner, K. Roemer, M. Boehm, C. Maack (2012). Adenosine A1-receptor agonism counteracts hypertrophy and fibrosis in response to alpha-adrenergic stimulation. Abstract: (P65) Posterpräsentation auf der Frontiers in Cardiovascular Biology Konferenz (FCVB; ESC) in London, Cardiovasc Res, Suppl 1, März 2012: V 93 → mit Auszeichnung versehen
- 6) **S.-L. Puhl**, A. Müller, Y. Devaux, M. Boehm, D. R. Wagner, C. Maack (2012). Adenosine-A1-receptor activation antagonizes alpha1-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. Abstract: (P1678) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2012
- 7) O. Adam, B. Loehfelm, T. Thum, S. K. Gupta, **S.-L. Puhl**, H.-J. Schaeffers, M. Boehm, U. Laufs (2011). Role of microRNA-21 for atrial remodeling during atrial fibrillation. Abstract: (86223) Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) in Paris 2011
- 8) O. Adam, B. Loehfelm, T. Thum, **S.-L. Puhl**, M. Boehm, U. Laufs (2011). Role of microRNA-21 for atrial remodeling during atrial fibrillation. Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2011: V 152
- 9) O. Adam, B. Loehfelm, T. Thum, **S.-L. Puhl**, M. Boehm, U. Laufs (2011). Rac1 GTPase regulates microRNA-21 via the lysyl-oxidase in the pathogenesis of atrial fibrosis and atrial fibrillation. Jahrestagung der American heart association (AHA) in Orlando 2011
- 10) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, A. Kasakov, M. Boehm, D. R. Wagner, C. Maack (2012). Adenosine A1 receptor upregulation in response to alpha-adrenergic receptor stimulation negatively feeds back on cardiac hypertrophy and fibrosis in vivo. Abstract (P811) Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) in München 2012, akzeptierte Posterpräsentation
- 11) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, A. Mueller, H. Kilter, M. Boehm, D. R. Wagner, C. Maack (2012). Exercise ameliorates maladaptive remodeling after myocardial infarction. Abstract (P113) Herbsttagung und Jahrestagung der AG Rhythmologie (DGK) – Basic Science Meeting in Hamburg 2012, akzeptierte Posterpräsentation

---

## 7.2 Originalarbeiten

- 1) O.Adam, B. Loehfelm, T. Thum, S.K. Gupta, **S.-L. Puhl**, H.-J. Schaefers, M. Boehm, U. Laufs (2012) Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Research in Cardiology*. 107 (5): 278. Epub 2012 Jul 4.
- 2) F. Azuaje, L. Zhang, C. Jeanty, **S.-L. Puhl**, S. Rodius, D. Wagner (2012). Analysis of a gene co-expression network unveils key role of Collagen 5a2 in myocardial infarction. *Cardiovasc Research im Druck*
- 3) **S.-L. Puhl**, Y. Devaux, D.R. Wagner, A. Kasakow, K. Roemer, M. Boehm, C. Maack. Adenosine A1 receptor upregulation in response to alpha-adrenergic receptor stimulation negatively feeds back on cardiac hypertrophy and fibrosis in vivo. In Vorbereitung
- 4) **S.-L. Puhl**, A. Mueller, Y. Devaux, H. Kilter, D.R. Wagner, K. Roemer, M. Boehm, C. Maack. Exercise ameliorates maladaptive remodeling after myocardial infarction. In Vorbereitung

---

## Danksagung

Herrn Professor Klaus Römer danke ich herzlich für die Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit, seine Unterstützung, die wissenschaftlichen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Michael Böhm danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Forschergruppe, die Überlassung des wissenschaftlich sehr interessanten Themas, die Begutachtung der vorliegenden Arbeit, seine Unterstützung, seine engagierte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und für die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Christoph Maack für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, seine Unterstützung, sein besonderes freundschaftliches Engagement für seine Arbeitsgruppe, die Motivation, das Vertrauen und seinen Enthusiasmus.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Inneren Medizin III, vor allem bei Lüsel, Georg, Nin, Matze, Gabi, Bumm, Juli, Catrin, Steffi, Michel, Nicole, 12 und Joaquin für die unglaublich schöne und lustige Atmosphäre, die tolle Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und den angenehmen Wahnsinn.

Dr. Daniel Wagner, Dr. Yvan Devaux, Céline Jeanty und ihrem Team danke ich herzlich für die Überlassung des Projekts, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die stete Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dipl. Biol. Andreas Müller für seine Hilfe und die interessante und gelungene Zusammenarbeit und bei Christina Körbel für die Einführung in die Echokardiographie und für ihre Hilfsbereitschaft.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, meinen Brüdern, meinen Großeltern und meiner besten Freundin Lilli für all ihre Unterstützung, die Motivation und den Halt, den sie mir geben und gegeben haben, oder einfach dafür, dass sie mein Leben ausmachen.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet

## **8 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Dissertation nicht enthalten.