

Aus dem  
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (IPEK)  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Christian Weber

**Die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Rezeptors GPR55  
im Angiotensin II-induzierten linksventrikulären  
Remodeling**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Brigitte Schopohl

aus  
München

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Sabine Steffens  
Mitberichterstatter: PD Dr. Sebastian Clauß  
PD Dr. Daniela Hauer

Mitbetreuung durch die Dr. Sarah-Lena Puhl  
promovierte Mitarbeiterin:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2025

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Pathologisches linksventrikuläres Remodeling .....	3
2.1.1 Hypertrophie .....	3
2.1.1.1 Prohypertrophe Signaltransduktion .....	4
2.1.1.2 Prohypertrophe Genexpression.....	6
2.1.2 Modulation der $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion im Zuge des hypertrophen Remodelings.....	7
2.1.3 Veränderungen der kardialen Kalziumhomöostase.....	7
2.1.4 Veränderungen des kardialen Metabolismus .....	8
2.1.5 Apoptose und Fibrose .....	9
2.1.6 Inflammatorische Antworten .....	10
2.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	11
2.2.1 Systemisches RAAS .....	11
2.2.2 Lokales RAAS.....	11
2.2.3 Physiologische Rolle des RAAS.....	11
2.2.4 Pathophysiologische Rolle des RAAS .....	12
2.3 GPR55 .....	13
2.3.1 Liganden von GPR55.....	13
2.3.2 Die GPR55 abhängige Signaltransduktion .....	14
2.3.3 Kardiovaskuläre Funktionen von GPR55.....	15
2.4 Zielsetzung der Dissertation.....	17
<b>3. Material</b> .....	<b>19</b>
3.1 Puffer und Lösungen.....	19
3.2 Kits .....	20

---

3.3 Antikörper.....	20
3.4 qPCR Primer und Sonden.....	22
3.5 Weitere Materialien .....	23
3.6 Computersoftware.....	26
<b>4. Methoden .....</b>	<b>27</b>
4.1 Mausmodell.....	27
4.1.1 Studienpopulation .....	27
4.1.2 Hypertrophie Modell .....	27
4.1.2.1 Pumpenvorbereitung und Implantation.....	27
4.2 Physiologische Messungen.....	28
4.2.1 Echokardiographie .....	28
4.2.1.1 Dobutamin Stress-Echokardiographie .....	30
4.3 Organentnahme und Aufbewahrung bis zur weiteren Prozessierung .....	30
4.4 Blutzuckerbestimmung.....	31
4.5 Molekularbiologische Methoden.....	31
4.5.1 Durchflusszytometrie (FACS).....	31
4.5.1.1 Zellvereinzelnung .....	31
4.5.1.2 Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen .....	32
4.5.1.3 Färbung der Oberflächenantigene.....	32
4.5.1.3.1 Antikörper Panel für die Durchflusszytometrie .....	33
4.5.1.4 Durchflusszytometrische Detektion der Zellen.....	34
4.5.1.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	34
4.5.2 Protein Analyse.....	40
4.5.2.1 Proteinisolation.....	40
4.5.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
4.5.2.3 SDS-Gelelektrophorese .....	41
4.5.2.4 Proteintransfer.....	42
4.5.2.5 Proteindetektion .....	42
4.5.2.6 Quantifizierung der Proteinexpression.....	43

4.5.3 RNA Analyse.....	43
4.5.3.1 RNA Isolation .....	43
4.5.3.2 Bestimmung der RNA Konzentration.....	43
4.5.3.3 cDNA Synthese.....	44
4.5.3.4 Quantitative Real-Time PCR .....	44
4.5.3.5 Quantifizierung der mRNA Expression .....	45
4.6 Histologie .....	46
4.6.1 Anfertigung von Herzschnitten .....	46
4.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
4.6.3 Sirius Red Färbung .....	48
4.7 Statistik .....	49
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
5.1 Einfluss von AngII auf die kardiale <i>Gpr55</i> Rezeptorexpression .....	50
5.2 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf das AngII-induzierte strukturelle LV Remodeling.....	50
5.3 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf hypertrophe Signalkaskaden .....	56
5.4 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die profibrotische Genexpression in der AngII-induzierten Hypertrophie.....	64
5.5 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Funktion in der AngII- induzierten Hypertrophie .....	66
5.6 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiomyozytäre Ca <sup>2+</sup> abhängige Signaltransduktion.....	72
5.7 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf kardiale metabolische Signalwege in der AngII-induzierten Hypertrophie.....	74
5.8 Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten Hypertrophie.....	78
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
6.1 Die <i>Gpr55</i> Deletion induziert basal eine diastolische LV-Dilatation in Weibchen .....	87

6.2 Die <i>Gpr55</i> Deletion hat keinen Einfluss auf das AngII-induzierte strukturelle Remodeling .....	88
6.3 Die <i>Gpr55</i> Deletion moduliert die hypertrophe Signaltransduktion.....	88
6.3.1 Die <i>Gpr55</i> Deletion supprimiert die Reexpression fetaler Gene in der AngII-induzierten Hypertrophie .....	88
6.3.2 Die <i>Gpr55</i> Deletion hat keinen Einfluss auf die AT1R vermittelte Signaltransduktion durch MAP-Kinasen .....	89
6.3.3 Die <i>Gpr55</i> Deletion induziert eine adaptive Signaltransduktion durch AKT in der AngII-induzierten Hypertrophie .....	90
6.4 Die <i>Gpr55</i> Deletion moduliert die kardiale Funktion .....	91
6.4.1 Die <i>Gpr55</i> Deletion steigert die Inotropie infolge der AngII Infusion.....	91
6.4.2 Die <i>Gpr55</i> Deletion vermindert behandlungsunabhängig die Chronotropie .....	91
6.4.3 Die <i>Gpr55</i> Deletion führt zum Erhalt der inotropen und chronotropen Reserve nach der AngII Infusion .....	92
6.5 Die <i>Gpr55</i> Deletion moduliert die Ca <sup>2+</sup> abhängige Signaltransduktion .....	93
6.6 Die <i>Gpr55</i> Deletion moduliert Signalwege der kardialen Substrataufnahme...	94
6.7 Die <i>Gpr55</i> Deletion führt zur Reduktion maladaptiver profibrotischer und proinflammatorischer Genexpression in der AngII-induzierten Hypertrophie ..	96
6.8 Die <i>Gpr55</i> Deletion moduliert die Größe isolierter Immunzellpopulationen in Milz, Blut und perikardialem Fettgewebe .....	97
6.9 Schlussfolgerung: Die <i>Gpr55</i> Deletion beugt dem maladaptiven Remodeling im Rahmen der AngII-induzierten pathologischen Hypertrophie vor .....	98
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>Publikationen</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung</b>	<b>110</b>
<b>Affidavit</b>	<b>111</b>
<b>Übereinstimmungserklärung</b>	<b>112</b>

---

Abb. 1: Schematische Darstellung der pathologischen exzentrischen und konzentrischen Hypertrophie .....	4
Abb. 2: Die GPR55 abhängige Signaltransduktion .....	15
Abb. 3: Gating Strategie zum Ausschluss von Zellaggregaten und -debris .....	35
Abb. 4: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im Blut .....	36
Abb. 5: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen in Knochenmark und Milz .....	37
Abb. 6: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im Herz .....	38
Abb. 7: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im perikardialen Fettgewebe .....	39
Abb. 8: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Lymphozyten im perikardialen Fettgewebe .....	39
Abb. 9: Kardiale <i>Gpr55</i> Rezeptorexpression in Folge chronischer AngII Infusion .....	50
Abb. 10: Gravimetrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die AngII- induzierte Hypertrophie in Weibchen .....	51
Abb. 11: Histologische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die AngII- induzierte LV Hypertrophie .....	52
Abb. 12: Echokardiographische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die AngII-induzierte LV Hypertrophie in Weibchen .....	54
Abb. 13: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die Reexpression fetaler Gene in der AngII- induzierten LV Hypertrophie in Weibchen .....	57
Abb. 14: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die Expression prohypertropher Transkriptionsfaktoren in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen .....	57
Abb. 15: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die AT1R Expression in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	59
Abb. 16: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die Aktivierung prohypertropher MAP-Kinasen in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	61
Abb. 17: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf adaptives und maladaptives AKT Signalling in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	63
Abb. 18: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale profibrotische Genexpression und LV Fibrose in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen .....	65
Abb. 19: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Funktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen .....	67
Abb. 20: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	70
Abb. 21: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf $\text{Ca}^{2+}$ abhängige Signalkaskaden in der AngII- induzierten LV Hypertrophie .....	73

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 22: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf kardiale metabolische Signalwege in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	75
Abb. 23: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die nüchtern Blutzuckerwerte in Weibchen.....	77
Abb. 24: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Immunzellpopulation in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen .....	79
Abb. 25: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Expression proinflammatorischer Faktoren in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	81
Abb. 26: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die inflammatorische Reaktion im perikardialen Fett in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen.....	82

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Puffer und Lösungen für die Probenaufbereitung zur Durchflusszytometrie.....	19
Tab. 2: Puffer für die Proteinisolation.....	19
Tab. 3: Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse.....	19
Tab. 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	20
Tab. 5: Primärantikörper zur Proteindetektion im Western Blot.....	21
Tab. 6: Sekundärantikörper zur Proteindetektion im Western Blot.....	22
Tab. 7: qPCR Primer von MWG (Eurofins Genomics) .....	22
Tab. 8: qPCR Primer von Life Technology (TaqMan Sonden) .....	22
Tab. 9: Verwendete Chemikalien nach alphabetischer Reihenfolge .....	23
Tab. 10: Verwendete Geräte nach alphabetischer Reihenfolge .....	25
Tab. 11: Antikörper Panel für die Durchflusszytometrie .....	33
Tab. 12: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für myeloide Zellen.....	35
Tab. 13: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für lymphozytäre Zellen .....	36
Tab. 14: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für Western Blot Analysen.....	41
Tab. 15: Reverse Transkription Ansatz für die cDNA Synthese .....	44
Tab. 16: Ansatz für qPCR Analysen .....	45
Tab. 17: Program für die qPCR Analyse (Fast qPCR Program).....	45
Tab. 18: Protokoll der Histokinette zur Entwässerung.....	46
Tab. 19: Protokoll der HE-Färbung.....	47
Tab. 20: Protokoll der Sirius Red Färbung.....	48
Tab. 21: Gravimetrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die strukturelle AngII-induzierte LV Hypertrophie in Männchen.....	55
Tab. 22: Echokardiographische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die strukturelle AngII-induzierte LV Hypertrophie in Männchen.....	55
Tab. 23: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die hypertrophe Genexpression in der AngII- induzierten LV Hypertrophie in Männchen .....	58
Tab. 24: Einfluss der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale profibrotische Genexpression in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen.....	66
Tab. 25: Echokardiographische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Funktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen .....	68
Tab. 26: Gravimetrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf den Flüssigkeitsgehalt der Lunge in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	68
Tab. 27: Echokardiographische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in der AngII-induzierten LV Hypertrophie mittels Dobutamin Stresstest .....	71
Tab. 28: Gravimetrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf Parameter des systemischen Stoffwechsels in der AngII-induzierten LV Hypertrophie .....	77

---

Tab. 29: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die kardiale Immunzellpopulation in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen.....	80
Tab. 30: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die inflammatorische Reaktion im perikardialen Fett in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen.....	83
Tab. 31: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die systemische, inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen.....	84
Tab. 32: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der <i>Gpr55</i> Deletion auf die systemische, inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen.....	85

## Abkürzungsverzeichnis

---

2-AG	2-Arachidonylglycerol
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym/Angiotensin converting enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AEA	Anandamid
AK	Antikörper
AKT/PKB	Proteinkinase B
AMPK	AMP-abhängige Kinase
AngII	AngiotensinII
ANP/ <i>Nppa</i>	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AT1R/ <i>Agtr1</i>	AngiotensinII-Rezeptor Typ 1
AT2R	AngiotensinII-Rezeptor Typ 2
BNP/ <i>Nppb</i>	B-Typ natriuretisches Peptid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CB1-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB2-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptor 2
<i>Ccl2</i>	CC-Chemokin-Ligand-2/Monocyte Chemotactic Protein-1
CD36/ <i>Cd36</i>	Scavenger-Rezeptor-B3
cDNA	complementary DNA
<i>Col I</i>	Kollagen 1/Collagen I
<i>Col III</i>	Kollagen 3/Colagen III
CPT1	Carnitin-Palmityltransferase 1
Ct	Cycle-treshold
CTGF/ <i>Ctgf</i>	Connective tissue growth factor
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure/deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Auswurfraction/Ejection fraction
ER/SR	Endoplasmatisches Retikulum/Sarkoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Durchflusszytometrie/Fluorescence activated cell sorting
FS	Verkürzungsfraction/Fractional shortening
FSC-H	Pulshöhe des Vorwärtsstreulicht/forward side scatter pulse height
FSC-W	Pulshöhe des Vorwärtsstreulicht/forward side scatter pulse width
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA4/ <i>Gata4</i>	Gata binding factor 4
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GPR55/ <i>Gpr55</i>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthasekinase 3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Salzsäure/Chlorwasserstoffsäure
HMV	Herzzeitminutenvolumen/cardiac output
HR	Herzfrequenz/Heart rate
i.p.	Intraperitoneal
<i>Iifng</i>	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 Receptor
IL-6/ <i>Il-6</i>	Interleukin-6
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
IVS;d/s	Interventrikuläres Septum/Interventricular septum; diastolisch/systolisch
JAK	Januskinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KO	GPR55 knock-out
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPI	Lysophosphatidylinositol
LV	Linksventrikulär
LVAW;d/s	Linksventrikuläre Vorderwand/Left ventricular anterior wall; diastolisch/systolisch
LVID;d/s	Linksventrikulärer Durchmesser/Left ventricular internal diameter; diastolisch/systolisch
LVPW;d/s	Linksventrikuläre Hinterwand/Left ventricular posterior wall; diastolisch/systolisch
LVvol;d/s	Linksventrikuläres Volumen/Left ventricular volume; diastolisch/systolisch
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF2c/ <i>Mef2c</i>	Myocyte enhancer factor 2c
MHC- $\alpha$ / <i>Myh6</i>	Myosin heavy chain isoform $\alpha$
MHC- $\beta$ / <i>Myh7</i>	Myosin heavy chain isoform $\beta$
MMP2/ <i>Mmp2</i>	Metalloproteinase-2
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NFAT/ <i>Nfat</i>	Nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OEA	Oleylethanolamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung/phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion/polymerase chain reaction
PEA	Palmitoylethanolamid
PGC1 $\alpha$ / <i>Ppargc1a</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
qPCR	quantitative Real- Time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleic acid /Ribonukleinsäure
Rock	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
S6K	Ribosomale S6 Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat/sodium dodecyl sulfate
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwerts/Standard error of the mean
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SSC-W	Pulsweite des Seitwärtsstreulicht/side scatter pulse width
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SV	Schlagvolumen
TAC	Transverse Aortenkonstriktion/transverse aortic constriction
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$ / <i>Tgf<math>\beta</math></i>	Transforming growth factor $\beta$
THC	$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol
<i>Tnfa</i>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp

Gene wurden als kursiv gekennzeichnet.

## 1. Zusammenfassung

Bluthochdruck zählt zu den zentralen kardiovaskulären Risikofaktoren und liegt der Ausbildung einer hypertensiven Herzerkrankung zugrunde. Um die erhöhte Nachlast zu kompensieren, kommt es dabei zur Größenzunahme der Kardiomyozyten, die zunächst in einer konzentrischen Hypertrophie resultiert. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems ist ein zentraler Mechanismus der Hypertonie und dem daraus resultierenden hypertrophen Remodeling. Dieses umfasst nicht nur hypertrophe Umbauprozesse des linken Ventrikels (LV) durch die Aktivierung prohypertropher Gen- und Proteinexpression, sondern auch eine Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion, metabolische Anpassungen und Änderungen der kardialen Kalziumhomöostase. Weiterhin kommt es zu proinflammatorischen und profibrotischen Prozessen im Herzmuskel. *In vitro* und *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass der Cannabinoid-sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptor 55 (GPR55) eine Rolle in der Regulation des Gefäßtonus, in der Migration und Aktivierung von Immunzellen, im zellulären Kalziumhandling und im Metabolismus peripherer Gewebe spielen könnte. Eine Beteiligung von GPR55 an diesen auch im Zuge des druckinduzierten LV Remodelings im Herzen stattfindenden Prozessen wurde bisher jedoch *in vivo* noch nicht untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, den Einfluss von GPR55 auf das Angiotensin II (AngII)-induzierte LV Remodeling im Mausmodell zu analysieren. Hierfür wurden weibliche und männliche 8 Wochen alte globale *Gpr55* defiziente (KO) und Wildtyp (WT) Mäuse einer kontinuierlichen AngII (1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) oder Vehikel Infusion über osmotische Minipumpen unterzogen. Nach 28-tägiger Infusion wurde der Phänotyp morphologisch, funktionell und molekularbiologisch charakterisiert.

Unabhängig von Geschlecht und Genotyp führte die AngII Infusion im Vergleich zu den jeweiligen Vehikel infundierten Kontrollen zu einem Stadium der adaptiven Hypertrophie mit erhaltener LV Funktion ohne Nachweis einer manifesten myokardialen Fibrose oder einer systemischen oder kardialen Expansion von Immunzellen. Allerdings war die strukturelle adaptive Hypertrophie in weiblichen Mäusen unabhängig vom Genotyp stärker ausgeprägt als in Männchen – übereinstimmend mit der klinisch erhöhten Prävalenz der neurohumoral induzierten Hypertrophie in weiblichen Patienten. Bezüglich maladaptiver Charakteristika führte der *Gpr55* KO jedoch unabhängig vom Geschlecht zu einer Inhibition der Reexpression der fetalen Gene infolge der kontinuierlichen AngII Infusion. Damit übereinstimmend war die AngII bedingte kardiale Expression der profibrotischen und proinflammatorischen Faktoren *Connective tissue growth factor* und *Interleukin-6* nach *Gpr55* Deletion supprimiert. Passend zu diesem protektiven Effekt führte AngII in Abwesenheit von *Gpr55* zu einer Steigerung der LV Auswurf- und Verkürzungsfraktion. Aufgrund der deutlicheren Ausprägung AngII-induzierter hypertropher

Antworten in Weibchen, erfolgte weiterhin eine detailliertere Charakterisierung der GPR55 Effekte in der weiblichen Kohorte anhand pro-hypertropher Signalwege und funktioneller Parameter. Dabei zeigte sich kein Einfluss der *Gpr55* Defizienz auf die Expression oder Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Dagegen war, hinweisend auf eine Aktivierung einer adaptiven Signaltransduktion, das Verhältnis des phosphorylierten Anteils der Proteinkinase B (AKT) zum Gesamtprotein in KO Herzen infolge der AngII Infusion erhöht. Darüber hinaus wiesen *Gpr55* defiziente Weibchen im Gegensatz zu WT Weibchen im Dobutamin Stresstest eine erhaltene  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit nach AngII Behandlung auf. Der damit einhergehende erhöhte Energiebedarf wird in Abwesenheit von *Gpr55* am ehesten durch einen gesteigerten Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel ausgeglichen. So zeigten KO Herzen bereits unabhängig vom Infusionstyp (AngII oder Vehikel) eine erhöhte *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* Expression als Zeichen einer erhöhten oxidativen Kapazität sowie eine erhöhte Expression des Lipidtransporters *Scavenger-Rezeptor-B3 (Cd36)* und des Glukosetransporters Typ 4. Daneben konnte eine distinkte Regulation der  $Ca^{2+}$  abhängigen Signaltransduktion in Form einer AngII-induzierten Hochregulation der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II sowie eine basale Expressionssteigerung von Calmodulin in Abwesenheit von *Gpr55* beobachtet werden.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass GPR55 insbesondere in Weibchen an der Regulation maladaptiver Remodelingprozesse beteiligt ist. So war dessen Depletion in der AngII-induzierten Hypertrophie mit einer Suppression der maladaptiven Genexpression, einem positiv inotropen Effekt, dem Erhalt der  $\beta$ -adrenergen Reserve und einer Modulation metabolischer Signalwege assoziiert. Dies deutet daraufhin, dass eine GPR55 Inhibition mit protektiven Effekten im Rahmen der hypertensiven Herzerkrankung einhergehen könnte und in Zukunft als neuer therapeutischer Ansatzpunkt, insbesondere in weiblichen Patienten, weiter evaluiert werden sollte.

## 2. Einleitung

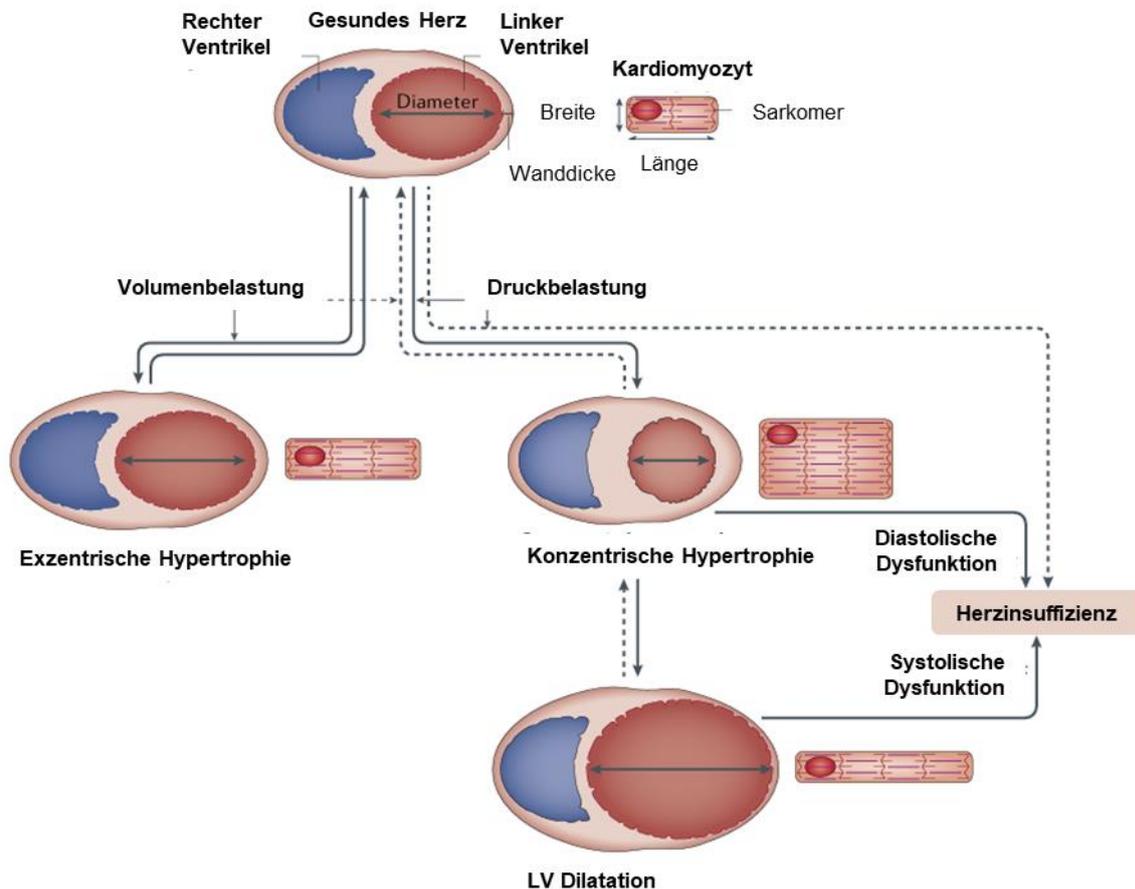
### 2.1 Pathologisches linksventrikuläres Remodeling

Nach Daten der WHO stellten Herz-Kreislaufkrankungen 2019 die weltweit häufigste Todesursache dar (1). Zu weit verbreiteten Krankheitsbildern zählen dabei ischämische Ereignisse, die hypertensive Herzerkrankung und Klappenvitien. Infolge dieser resultiert ein erhöhter kardialer Stress entweder durch den Untergang von vitalem Myokard oder durch eine Druck- oder Volumenbelastung (2). Um die kardiale Funktion zu erhalten, werden daraufhin Kompensationsmechanismen aktiviert, die zur Ausbildung einer ventrikulären Hypertrophie führen. Dabei kommt es neben einer Zunahme der Kardiomyozytengröße zu zahlreichen weiteren Umbauvorgängen im Herz, die als kardiales Remodeling zusammengefasst werden. Zu diesen zählen neben der Hypertrophie die Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion, Änderungen der kardialen Kalziumhomöostase und des kardialen Metabolismus sowie entzündliche und fibrotische Prozesse im Herzmuskel. Sistiert der kardiale Stressor nicht, kommt es im Verlauf zur Maladaptation und Abnahme der Herzfunktion (3-5). Eine entscheidende Rolle für den Übergang von Adaptation in Richtung Maladaptation spielt dabei die dauerhafte Aktivierung neuroendokriner Hormonsysteme, wie dem sympathischen Nervensystem und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die die Krankheitsprogression forcieren. Dabei spielt das RAAS, dessen Haupteffektor AngiotensinII (AngII) ist, nicht nur eine zentrale Rolle als Blutdruckregulator, sondern zählt auch zu den direkten, lokalen Induktoren des kardialen Remodelings (6, 7). Die Modulation AngII-induzierter Prozesse stellt somit einen entscheidenden Ansatzpunkt zur Therapie des pathologischen Remodelings dar.

#### 2.1.1 Hypertrophie

Grundsätzlich können beruhend auf tierexperimentellen und humanen Daten zwei morphologische Formen der Hypertrophie unterschieden werden. Dabei wird die exzentrische von der konzentrischen Hypertrophie abgegrenzt (Abb. 1). Eine chronische Volumenbelastung führt zu einer Zunahme der diastolischen Wandspannung, die in einer Längenzunahme der Kardiomyozyten, Dilatation des linken Ventrikels und somit exzentrischen Hypertrophie resultiert (2). Infolge einer andauernden Druckbelastung, wie im Rahmen einer Hypertonie, kommt es dagegen zu einem Anstieg der systolischen Wandspannung. Dieser kann nach dem Gesetz von Laplace durch die Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie mit Zunahme der Kardiomyozytendicke und damit der Wanddicke entgegengewirkt werden (2, 4). Aufgrund einer erhöhten Steifigkeit des Myokards kann eine konzentrische Hypertrophie jedoch in einer eingeschränkten Füllungskinetik und diastolischen Dysfunktion resultieren (8, 9). Zudem nimmt die myokardiale Masse zu und begünstigt eine schlechtere Perfusion des Herzmuskels (10). Einer weiteren Progression der Erkrankung folgt eine Dekompensation mit Dilatation des linken

Ventrikels, systolischer Dysfunktion und folglich Abnahme der Auswurfraction (2, 4). Die Ausbildung der strukturellen Hypertrophie unterliegt der Kontrolle prohypertropher Signalkaskaden (3, 11).



### Abb. 1: Schematische Darstellung der pathologischen exzentrischen und konzentrischen Hypertrophie

Die exzentrische Hypertrophie entsteht infolge einer chronischen Volumenbelastung, die in einer Längenzunahme der Kardiomyozyten und einer linksventrikulären Dilatation resultiert. Die konzentrische Hypertrophie entsteht infolge einer chronischen Druckbelastung, welche zu einer Zunahme der Kardiomyozytendicke, der linksventrikulären Wanddicke und einer diastolischen Dysfunktion führt. Bei anhaltendem pathologischen Stimulus kann es im Verlauf zur linksventrikulären Dilatation und systolischen Dysfunktion kommen.

Veränderte Darstellung nach: Nakamura et al., 2018 (4)

#### 2.1.1.1 Prohypertrophe Signaltransduktion

Die Induktion prohypertropher Signalwege wurde in zahlreichen zellulären und tierexperimentellen Studien untersucht und erfolgt durch die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie des AngII-Rezeptor Typ 1 (AT1R), des Endothelin-1 Rezeptors und der  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Adrenozeptoren, aber auch durch mechanische Signale oder Wachstumsfaktoren (3, 11, 12).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können über die Kopplung an Gq/11 die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) durch die Phospholipase C (PLC) vermitteln. Infolgedessen erfolgt eine Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch IP<sub>3</sub> sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG (13). Der Einfluss der PKC auf das linksventrikuläre Remodeling ist dabei abhängig von der jeweiligen Isoform. So ist eine erhöhte Expression der konventionellen Isoformen PKC $\alpha$  und  $\beta$  in Mäusen mit einer Reduktion der linksventrikulären (LV) Funktion assoziiert (14, 15), während die chronische *in vivo* Aktivierung der neueren Isoformen PKC $\delta$  und  $\epsilon$  zu einer kompensierten Hypertrophie führt (16).

Über die Aktivierung kleiner GTP (Guanosintriphosphat)-bindender Proteine, wie RAS und Rho, kann zudem eine Signalübertragung über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), wie ERK (Extrazellulär regulierte Kinase) und p38, ausgelöst werden (5, 11). Die vermehrte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK induziert *in vitro* und *in vivo* eine gesteigerte Proteinsynthese und Zellwachstum. Dadurch stellt sie einen wichtigen Regulator der hypertrophen Antwort dar und ist involviert in die Vermittlung der AngII-induzierten pathologischen Hypertrophie (11, 17). Dabei deuten *in vitro* und *in vivo* Daten daraufhin, dass die Aktivierung des AT1R über die G $\gamma$  $\beta$ -Untereinheit eine Autophosphorylierung von ERK an Thr188 induzieren kann. Diese scheint zu einer vermehrten Phosphorylierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren und so zur Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie zu führen (18).

Eine transgen induzierte dauerhafte Aktivierung von ERK im murinen Bluthochdruckmodell führt jedoch zu einer konzentrischen Hypertrophie mit erhaltener kardialer Funktion und weist somit auf eine adaptive Rolle der Kinase hin (19). Damit übereinstimmend zeigte sich im TAC (transverse aortic constriction) Mausmodell der LV Druckbelastung eine Aktivierung von ERK in der Phase der kompensierten Hypertrophie, während eine Herabregulation von ERK den Übergang zur Herzinsuffizienz markierte (20). Zu den MAP-Kinasen zählt zudem p38, die wichtige Funktionen in der kardialen Entwicklung und Apoptose ausübt. Dabei demonstrierten zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien eine pathologische Rolle von p38 mit profibrotischen und negativ inotropen Effekten, die zur Abnahme der Kontraktilität und Progression einer Herzinsuffizienz beitragen (21). Weitere durch AngII-induzierte prohypertrophe Mediatoren umfassen die Familie der C-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), den JAK-STAT (Januskinase- signal transducers and activators of transcription) Signalweg sowie den, durch die Aktivierung der NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat)-Oxidase getriggerten, Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (11, 13).

Daneben kann im Rahmen der pathologischen Hypertrophie eine Phosphorylierung der Proteinkinase AKT (Proteinkinase B; PKB) über die G $\beta$  $\gamma$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und die Aktivierung der nachgeschalteten p110 $\gamma$  Untereinheit der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) initiiert werden. Dabei konnte tierexperimentell bereits gezeigt werden,

dass AKT Zellwachstum und Angiogenese vermittelt und ein wichtiger Mediator der adaptiven konzentrischen Hypertrophie ist. Eine dauerhafte übermäßige *in vivo* Aktivierung von AKT kann jedoch zu Maladaptation und Abnahme der kardialen Funktion beitragen (22). Darüber hinaus ist AKT ein zentraler Vermittler der physiologischen Hypertrophie. Im Rahmen dieser wird die Phosphorylierung von AKT über den IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 Receptor)-PI3K Signalweg und die p110 $\alpha$  Untereinheit eingeleitet (11). Ein wichtiger Downstream Effektor von AKT ist die prohypertrophe Ribosomale S6 Kinase (S6K), während zugleich eine Inhibition der wachstumshemmenden Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) erfolgt (11, 22). Die genannten Proteinkinasen können durch Phosphorylierungen Effektorproteine aktivieren oder deaktivieren und so unter anderem die Heraufregulation prohypertropher Transkriptionsfaktoren induzieren (3, 11, 23).

### 2.1.1.2 Prohypertrophe Genexpression

Eine experimentelle *in vitro* oder *in vivo* Aktivierung prohypertropher Signalkaskaden führt zu Änderungen der kardiomyozytären Genexpression. Transkriptionsfaktoren, wie die „immediate early“ Gene, als auch MEF2C (Myocyte enhancer factor 2c) sowie GATA4 (Gata binding factor 4), kontrollieren Gene, die für Proteine kodieren, die in Kontraktilität, Ca<sup>2+</sup> Handling und Zellwachstum involviert sind (11, 24, 25). Dabei erfolgt in Ratten die Induktion der „immediate early“ Gene, wie *c-Myc* und *c-Fos*, schon innerhalb der ersten Stunde infolge einer akuten kardialen Druckbelastung (26). Darüber hinaus weisen tierexperimentelle Daten daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor GATA4 insbesondere für die Entwicklung einer adaptiven Hypertrophie von Bedeutung ist (27). Zudem wird GATA4 neben MEF2C zu den Regulatoren des sogenannten fetalen Genprogramms gezählt (24, 27).

Hierbei kommt es in Patienten wie auch im Tiermodell zur Reexpression von Genen, die im fetalen Herz exprimiert und nach Geburt herunterreguliert werden. Diese Reaktivierung dient zunächst der Anpassung an einen kardialen Stressor, ist jedoch mit der Ausbildung maladaptiver Merkmale und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert (11, 24). Dabei kommt es zu einer Heraufregulation der natriuretischen Peptide ANP (Atriales natriuretisches Peptid; *Nppa*) und BNP (B-Typ natriuretisches Peptid; *Nppb*) im linken Ventrikel, die unter physiologischen Bedingungen im Herz adulter Säugetiere nur noch in den Vorhöfen exprimiert werden. Die natriuretischen Peptide bewirken eine Vasodilatation und Zunahme der Diurese und dienen der Gegenregulation der AngII bedingten Vasokonstriktion und Blutdrucksteigerung (28). Weiterhin kommt es zur Reexpression der fetalen Myosin Schwerkettenisoform  $\beta$  (*MHC- $\beta$* ; myosin heavy chain isoform  $\beta$ ; *Myh7*) anstelle der adulten Isoform  $\alpha$ -MHC (myosin heavy chain isoform  $\alpha$ ; *Myh6*). MHC- $\beta$  ist im Vergleich zur adulten Isoform mit einem niedrigeren Energieverbrauch, jedoch auch mit einer verringerten Kontraktilität assoziiert (11, 29). Darüber hinaus stellen das Peptidhormon BNP sowie ein Aminosäurefragment dessen Prohormons, NT-

proBNP, etablierte diagnostische und prognostische Biomarker für Herzversagen im klinischen Alltag dar. Zudem sind BNP, ANP und MHC- $\beta$  wichtige Hypertrophiemarker in kardialen Zellkulturen und Tiermodellen (28, 30).

### **2.1.2 Modulation der $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion im Zuge des hypertrophen Remodelings**

Neben der hypertrophen Antwort ist der Übergang von Adaptation zur Maladaptation und letztlich die Entwicklung einer Herzinsuffizienz von Apoptose, Fibrose und Inflammation sowie von metabolischen und funktionellen Umbauprozessen des Kardiomyozyten gekennzeichnet (3, 4, 11). Im Zuge einer chronischen Hypertonie und Herzinsuffizienz kommt es zu einem erhöhten Sympathikotonus sowie zum Anstieg der Katecholaminlevel im Plasma betroffener Patienten (4, 6). Eine kurzfristige Aktivierung von  $\beta$ 1-Adrenozeptoren kann durch deren positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Wirkung einer vermehrten kardialen Belastung entgegenwirken und zum Erhalt der kardialen Funktion beitragen. Sowohl tierexperimentelle als auch humane Daten belegen jedoch, dass dauerhaft erhöhte Katecholaminspiegel zu kardiotoxischen Effekten führen (6, 31). Zudem führt eine anhaltende adrenerge Stimulation zur Desensibilisierung und Herabregulation der  $\beta$ 1-Adrenozeptoren und somit zu einer verminderten chronotropen Reserve und Abnahme der Kontraktilität (6, 32). Die reduzierte Expression von  $\beta$ 1-Adrenozeptoren kann schützend gegen die kardiotoxischen Effekte einer chronischen adrenergen Aktivierung wirken. Zugleich ist jedoch die schnelle Anpassung an eine akute kardiale Belastung, wie eine Erhöhung der kardialen Nachlast oder ein gesteigerter peripherer Sauerstoffbedarf, beeinträchtigt (3, 6, 11).

### **2.1.3 Veränderungen der kardialen Kalziumhomöostase**

$\text{Ca}^{2+}$  ist das zentrale Element der elektromechanischen Kopplung. Dabei bewirkt die Depolarisation der Zellmembran in Kardiomyozyten einen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der zu einer  $\text{Ca}^{2+}$  induzierten  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) führt. Durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wird die Kontraktion des Kardiomyozyten induziert (3, 33). Das kardiale Remodeling führt jedoch zu Änderungen der kardialen Kalziumhomöostase, die bereits ausführlich *in vitro* und *in vivo* untersucht wurden (3, 11, 33, 34). Dabei kommt es unter anderem zur Hemmung der SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase), die  $\text{Ca}^{2+}$  zurück in das SR pumpt. Zum einen steigt dadurch die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration im Zytosol und beeinträchtigt die Relaxation, zum anderen resultiert daraus eine zunehmende Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher des SR und somit eine Abnahme der Kontraktilität (3, 33). Die Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten ist nicht nur essenziell für die Steuerung der kardialen Kontraktion und Relaxation.  $\text{Ca}^{2+}$  stellt auch einen

wichtigen intrazellulären Botenstoff und Regulator verschiedener prohypertropher Signalkaskaden dar. Wichtige durch  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuerte Signalkaskaden sind dabei der Calmodulin/CaMKII (Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II)- und der Calmodulin/Calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) Signalweg. Darüber kann eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration im Kardiomyozyten Einfluss auf die Transkription myokardialer Gene und die LV Hypertrophieinduktion nehmen (11, 33).

#### **2.1.4 Veränderungen des kardialen Metabolismus**

Zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion und um seinen hohen Energieverbrauch zu decken, ist das Herz von Säugetieren fähig, verschiedenste Substrate zu verwerten. Dabei zieht das gesunde Herz etwa 60-90% seines Energiebedarfs aus Fettsäuren, während die übrigen 10-40% durch Glukose und Laktat gedeckt werden. Weiterhin kann auch aus Aminosäuren und Ketonkörpern Energie gewonnen werden (3, 35). Bei Änderungen des Sauerstoff- und Substratangebots oder des Energiebedarfs passt sich der kardiale Stoffwechsel an, um die Energiezufuhr zu sichern. So ist auch das ventrikuläre Remodeling von Änderungen des kardialen Metabolismus gekennzeichnet, die bisher vor allem auf zellulärer und tierexperimenteller Ebene, aber auch in humanem Myokard untersucht wurden (3, 36). Dabei steigt infolge einer andauernden Druckbelastung des Herzens der kardiale Energiebedarf. Zudem können eine Zunahme der Herzgröße und eine verlängerte Diffusionsstrecke zu einer verringerten Sauerstoffzufuhr führen (3). Daraufhin nimmt die Verbrennung von Kohlenhydraten, insbesondere die anaerobe Oxidation, zu. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz nimmt zudem die Fettsäureoxidation ab, die mit einem höheren Sauerstoffverbrauch einhergeht (3, 36). Dieser Substratshift wird durch eine Herabregulation des Transkriptionsfaktors PGC1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; *Ppargc1a*), der den Lipidstoffwechsel sowie die mitochondriale Biogenese fördert, reguliert (36, 37). Obwohl dies als kompensatorischer Mechanismus an das begrenzte Sauerstoffangebot angesehen wird, ist dieser im Verlauf mit der Anhäufung toxischer Metabolite und der Entwicklung einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert (3, 4, 35). Dagegen kann eine Aktivierung der AMPK (AMP-abhängige Kinase) protektiv wirken und zu einer Forcierung des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels führen. Die AMPK wird bei Energiemangel und Anstieg der intrazellulären AMP Konzentration durch Phosphorylierung aktiviert (38). Zu den nachgeschalteten Effektoren zählen das Transportprotein CD36 (Scavenger-Rezeptor-B3), das die Aufnahme von Fettsäuren durch das Sarkolemm in den Kardiomyozyten reguliert, sowie der Insulinabhängige Glukose Transporter GLUT4 (Glukosetransporter Typ 4) (39). Weiterhin führt die Aktivierung des Insulinrezeptors über das nachgeschaltete IRS-1 (Insulinrezeptorsubstrat-1) zum Transport von GLUT4 zum Sarkolemm und so zur Steigerung der Glukoseaufnahme (40). Die Aktivität des IRS wird durch Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste reguliert. Dabei führt die Phosphorylierung

des Serin 612 zu einer Hemmung des IRS und damit einer erhöhten Insulinresistenz (41). Folglich werden Anpassungen des Stoffwechsels von Änderungen der kardialen Genexpression und der Aktivität von Enzymen sowie von Glukose- und Lipidtransportern begleitet. Infolgedessen kann sich die Umstellung des kardialen Metabolismus auf das kardiale Remodeling auswirken und Einfluss auf die Ausprägung der Hypertrophie sowie die kardiale Funktion nehmen (4, 35, 39).

### 2.1.5 Apoptose und Fibrose

Eine verschlechterte kardiale Energieversorgung und die Akkumulation toxischer Metabolite kann zudem zu vermehrtem Zelltod beitragen (4). Die Zunahme der Apoptose von Kardiomyozyten zählt zu den Merkmalen der pathologischen Hypertrophie, die diese von der physiologischen Hypertrophie unterscheidet (11). Basierend auf tierexperimentellen Daten gehören neben metabolischen Faktoren zu den Auslösern der Apoptose inflammatorische Prozesse, oxidativer Stress und die Ausschüttung neurohumoraler Mediatoren (3, 6). Durch die Abnahme vitaler Kardiomyozyten kommt es weiterhin zu einem fibrotischen Umbau des Herzmuskels (11).

So kommt es in Patienten nach einem Myokardinfarkt zum Umbau des untergegangenen Myokards in fibröses Narbengewebe, wohingegen es im Falle einer pathologischen Hypertrophie zur vermehrten Kollagenablagerung im gesamten Myokard kommt (42, 43). Die zugrundeliegenden Mechanismen und funktionellen Auswirkungen einer kardialen Fibrose wurden in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien näher untersucht. Eine vermehrte Produktion profibrotischer Faktoren stimuliert dabei die kardialen Fibroblasten zur Produktion von extrazellulärer Matrix (3, 11). Zu diesen zählen TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) und CTGF (Connective tissue growth factor), die in zell- und tierexperimentellen Studien als zentrale Induktoren der myokardialen Fibrose definiert wurden (42, 44). Darüber hinaus führt eine Hemmung von CTGF im murinen Modell eines Myokardinfarkts sowie der dilatativen Kardiomyopathie zum Erhalt der kardialen Kontraktilität und erhöhte CTGF Plasmalevel sind in Patienten mit einem fortgeschrittenen Stadium einer akuten Herzinsuffizienz assoziiert (45-47). Weiterhin sind Enzyme, wie die MMP2 (Metalloproteinase-2), am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt (48). Im Rahmen der myokardialen Fibrose kommt es zur Ablagerung verschiedener Kollagentypen, wobei insbesondere ein Anstieg des Verhältnis der Kollagen I zu Kollagen III Expression (*Col I/Col III-Ratio*) eine erhöhte Steifigkeit des Myokards anzeigt (43). Funktionell kann durch die Narbenbildung nach Myokardinfarkt die Erregungsleitung des Herzens gestört und so die Entstehung von Arrhythmien begünstigt werden (3, 42). Zudem kann eine linksventrikuläre Dilatation sowie ein adverses Remodeling des verbleibenden, vitalen Myokards zur Abnahme der kardialen Funktion beitragen (2, 42). In der pathologischen Hypertrophie kommt es dagegen durch eine diffuse Fibrose des Myokards insbesondere zu einer Behinderung der Relaxation des

Herzmuskels und somit zu einer diastolischen Dysfunktion (3, 9, 43). Weitere Mechanismen, unter anderem eine Beeinträchtigung der myokardialen Sauerstoffversorgung durch eine Verlängerung der Perfusionsstrecke und eine mikrovaskuläre Dysfunktion sowie eine Störung der elektromechanischen Kopplung, könnten im Verlauf zur Entwicklung einer systolischen Dysfunktion beitragen (42, 43).

### 2.1.6 Inflammatorische Antworten

Es ist bekannt, dass entzündliche Prozesse im Rahmen zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Myokardinfarkten, Endo- und Myokarditiden und bei Herzinsuffizienz, eine Rolle spielen. Dabei kommt es, wie in zahlreichen *in vivo* Studien demonstriert, zur Proliferation und Einwanderung von Leukozyten ins Myokard und zur Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren (49). Experimentelle Daten legen zudem nahe, dass eine inflammatorische Antwort auch in der hypertensiven Herzerkrankung eine Rolle spielt. So bewirkt eine chronische AngII Infusion in Ratten die Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten aus der Milz zum Herz (50). Darüber hinaus induziert AngII eine Expansion der Makrophagenpopulation im Mauserz. Diese beruht sowohl auf einer Vermehrung residenter Makrophagen als auch auf einwandernden Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren (51). Während letztere vorwiegend eine proinflammatorische und profibrotische Wirkung ausüben, besitzen weitere Makrophagensubpopulationen proreparative und proangiogene Wirkungen (52). Dabei können einzelne Makrophagen Subpopulationen anhand verschiedener Kriterien voneinander abgegrenzt werden. So werden beispielsweise proinflammatorische und proreparative Makrophagen von unterschiedlichen Zytokinen aktiviert (53). Darüber hinaus zeigen neuere *in vitro* und *in vivo* Erkenntnisse, dass die kardialen Makrophagen weiter nach Herkunft, Expression von Oberflächenmolekülen, Metabolismus und Zytokinproduktion differenziert werden können und demnach eine ausgeprägte Heterogenität der einzelnen Subpopulationen besteht (49, 52). Eine Modulation der hypertensiven Herzerkrankung wurde zudem durch Lymphozyten beschrieben. So ist eine Depletion von T-Zellen in der druckinduzierten Hypertrophie im Mausmodell mit einer besseren kardialen Funktion assoziiert (54). Zudem scheinen sowohl B- als auch T-Zellen eine mögliche Rolle in der murinen Blutdruckregulation zu spielen (55, 56). Weiterhin sind neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen in kardiovaskuläre Erkrankungen involviert, deren Einfluss auf das kardiale Remodeling bisher *in vivo* vor allem nach Myokardinfarkt untersucht wurde (53, 57). Durch Leukozyten, aber auch Fibroblasten, werden zudem proinflammatorische Faktoren ausgeschüttet, die an der Regulation des hypertrophen Remodelings beteiligt sind (53). Zu den Auslösern dieser inflammatorischen Antwort zählt dabei die neurohumorale Aktivierung, insbesondere des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (58) .

## **2.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

### **2.2.1 Systemisches RAAS**

Die hypertensive Herzerkrankung gilt als eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (59). Somit gehört Bluthochdruck zu den kardiovaskulären Hauptrisikofaktoren. Einen der wichtigsten Regulatoren des Blutdrucks stellt das RAAS dar.

Bei Abfall des renalen Perfusionsdrucks oder der Natriumkonzentration im distalen Tubulus sowie durch  $\beta$ 1-adrenerge Stimulation wird Renin aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparats der Niere freigesetzt. Renin ist eine Aspartatprotease und spaltet das in der Leber synthetisierte Peptid Angiotensinogen in Angiotensin I. Angiotensin I wird durch das auf Endothelzellen exprimierte Angiotensin converting enzyme (ACE) zu dem 8 Aminosäure langen, vaso-konstriktorisch wirksamen Peptidhormon Angiotensin II gespalten. Hauptmediator der kardiovaskulären Effekte von Angiotensin II ist der AT1R, daneben kann AngII aber auch den Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2R) binden (13, 60). Weiterhin können sowohl Angiotensin I als auch Angiotensin II von dem Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) zu Angiotensin (1-7) gespalten werden. Dadurch wird zum einen die Bildung und somit die Menge von AngII in der Zirkulation reduziert, zum anderen induziert Angiotensin (1-7) eine Vasodilatation (7, 13, 60).

### **2.2.2 Lokales RAAS**

Neben dem systemischen RAAS kann AngII in fast allen großen Organen, unter anderem in Gehirn, Herz, in den Nieren und im Gefäßsystem, durch ein gewebespezifisches RAAS gebildet werden (7). Dabei kann AngII auch durch alternative Synthesewege hergestellt werden. So kann im menschlichen Herz das Enzym Chymase AngII produzieren (58, 61). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass das lokale RAAS durch autokrine und parakrine Signalübertragung im kardiovaskulären System zur physiologischen und pathologischen Modulation von Gefäßtonus, kardialer Kontraktilität und durch chronische Aktivierung zum Remodeling beitragen kann (7, 61).

### **2.2.3 Physiologische Rolle des RAAS**

Das RAAS ist ein essenzieller Bestandteil der kurz- und langfristigen Regulation des Blutdrucks und sichert die Organperfusion und hämodynamische Stabilität. So steuert es den Elektrolyt- und Volumenhaushalt sowie den Gefäßtonus. Darüber hinaus unterstützt es die schnelle Anpassung des Blutdrucks, beispielsweise bei Lagewechsel, und ist damit Teil der Orthostasereaktion (13).

Die Aktivierung des AT1R durch AngII führt im Gefäßsystem zu einer Vasokonstriktion, erhält die glomeruläre Filtrationsrate der Niere aufrecht und wirkt am Herz positiv inotrop und chronotrop. In der Nebenniere induziert AngII am AT1R die Produktion und Ausschüttung von Aldosteron, das die renale Natriumrückresorption kontrolliert (58, 62). Zudem erfolgt im Hypothalamus infolge einer AT1R Stimulation die Freisetzung von ADH (Antidiuretisches Hormon), das ebenfalls vasokonstriktorisch wirksam ist und die renale Diurese hemmt (6). Zu den zentralen Funktionen von AngII zählen weiterhin die Verstärkung eines Durstgefühls und der Flüssigkeitsaufnahme sowie eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems (6, 62). Im Gegensatz zum AT1R ist der AT2R unter physiologischen Bedingungen vor allem in der Fetalzeit stark exprimiert, kann aber im Rahmen pathologischer Prozesse heraufreguliert werden (13, 62).

#### 2.2.4 Pathophysiologische Rolle des RAAS

Die Aktivität des RAAS und seine lebenswichtigen Funktionen bei der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und Sicherstellung der Organperfusion sind fein abgestimmt. Unter pathologischen Bedingungen kann es jedoch zur chronischer Überaktivierung des Systems und folglich kardiovaskulären Erkrankungen kommen (6, 62). So führt eine dauerhafte Aktivierung des RAAS zu Bluthochdruck, ausgelöst durch Vasokonstriktion, Salz- und Flüssigkeitsretention sowie einer Erhöhung des Sympathikotonus. Letztere ist Teil einer neurohumoralen Aktivierung und trägt zu vermehrter Arrhythmieeigung bei (58, 62).

Die Überaktivierung des RAAS ist zudem an der Entstehung von Atherosklerose und vaskulären Aneurysmen beteiligt. Auf zellulärer Ebene kommt es dabei zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und folglich oxidativem Stress sowie zu Zellwachstum, Proliferation, endothelialer Dysfunktion, extrazellulärer Matrixproduktion und Apoptose (13). Weiterhin reduziert AngII die Nierendurchblutung. Zudem beschreiben *in vitro* und *in vivo* Studien renale und kardiale proinflammatorische und profibrotische Wirkungen durch AngII. Im Verlauf können diese in einer chronischen Niereninsuffizienz und dadurch in einer weiteren Aggravation der Hypertension resultieren (58, 60). Am Herzen zählt AngII darüber hinaus zu den zentralen Mediatoren der Kardiomyozytenhypertrophie (58, 60, 62).

Dabei werden die oben beschriebenen Mechanismen überwiegend durch den AT1R vermittelt (13, 58, 62). Zelluläre und tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass eine Aktivierung des AT2R diesen durch die Vermittlung vasodilatatorischer, wachstumshemmender, antifibrotischer und antiinflammatorischer Effekte entgegenwirken kann (7, 58). Einige Studien deuten jedoch an, dass der AT2R im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen ähnlich dem AT1R vasokonstriktorisch sein und seine günstigen Wirkungen verlieren kann (7, 63, 64).

Darüber hinaus wird die Bedeutung des RAAS bei der Entstehung hypertensiver Herzerkrankungen durch den Erfolg von Medikamenten, die Komponenten des RAAS inhibieren, unterstrichen. Dazu zählen ACE-Hemmer, AT1R Antagonisten und Aldosteronrezeptorantagonisten. Diese gehören zu den Medikamenten der ersten Wahl bei Bluthochdruck sowie zu den zentralen Pfeilern der Herzinsuffizienztherapie (65, 66). Dennoch bleibt die Herzinsuffizienz einer der häufigsten Gründe für stationäre Krankenhausaufenthalte und Sterblichkeit in Deutschland (67). Dies hebt die Notwendigkeit neuer therapeutischer Angriffspunkte hervor.

## 2.3 GPR55

Im Jahr 2019 haben weltweit rund 200 Millionen Menschen Cannabis konsumiert, was einem Anstieg von beinahe 18% im letzten Jahrzehnt entspricht (68). Zugleich wurde wiederholt ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Cannabisprodukten und dem Auftreten kardiovaskulärer Nebenwirkungen, wie Arrhythmien und Myokardinfarkten, sowie hämodynamischen Veränderungen berichtet (69, 70). Wechselwirkungen zwischen Endocannabinoid- und Herzkreislaufsystem sollten daher näher definiert werden. GPR55 (G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55) ist ein G-protein-gekoppelter Rezeptor, der zu der Gruppe der 7-Transmembranrezeptoren zählt. Er wird im Menschen in großen Teilen des Nervensystems exprimiert, daneben aber auch auf zahlreichen weiteren Zellen und Organsystemen, wie auf Endothelzellen, Immunzellen und in Niere, Plazenta und Knochen (71). Aufgrund seiner Fähigkeit, Endocannabinoide zu binden, wurde er als möglicher dritter Cannabinoid-Rezeptor neben den klassischen Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2 vorgeschlagen. Jedoch besitzt GPR55 nur eine geringe Sequenzhomologie mit den klassischen Cannabinoid-Rezeptoren sowie statt der klassischen hydrophoben, eine hydrophile Bindetasche, weswegen der Rezeptor lediglich als Cannabinoid-sensitiver Lipidrezeptor gilt (71, 72).

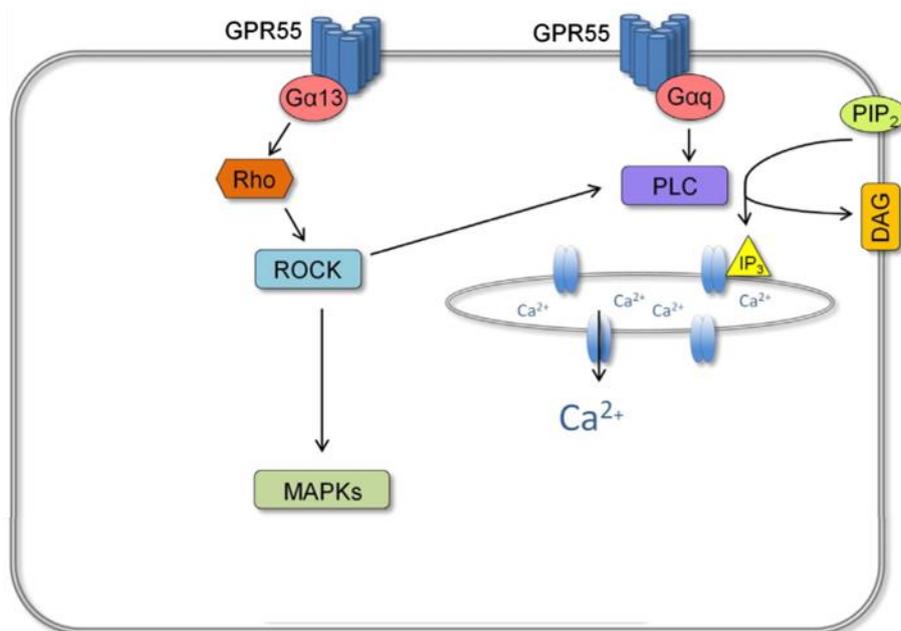
### 2.3.1 Liganden von GPR55

Entsprechend der Klassifikation von GPR55 als Lipidrezeptor, stellt das Phospholipid Lysophosphatidylinositol (LPI) einen potenten, endogenen Liganden und Agonisten von GPR55 dar (69, 72, 73). Es wurde gezeigt, dass LPI von verschiedensten humanen und nicht-humanen Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, Immunzellen, Thrombozyten und Tumorzellen, produziert werden kann. LPI wird dabei durch die ubiquitär exprimierte Phospholipase A2 aus Phosphatidylinositol gebildet, wobei Arachidonsäure freigesetzt wird, kann aber auch durch die Phospholipase A1 synthetisiert werden (74). Neben LPI wurden mittels *in vitro* Experimenten weitere Lipidmediatoren, wie Palmitoylethanolamid (PEA), Oleoylethanolamid (OEA) und Lysophosphatidylcholin (LPC), als GPR55 Agonisten definiert (75, 76). Darüber hinaus wurde die Bindung von Cannabinoidliganden an GPR55 in zahlreichen zellulären Studien untersucht (76-79). Dabei divergieren die Ergebnisse hinsichtlich der Ligandenaktivität. Grundsätzlich

wurden die Endocannabinoide 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und Anandamid (AEA) sowie das Phytocannabinoid  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) als Agonisten beziehungsweise Partialagonisten an GPR55 beschrieben, während das pflanzliche Cannabidiol den GPR55 Antagonisten zugeordnet wird (69, 72, 73). Zudem wurde eine Reihe synthetischer Cannabinoide, wie abnCBD, O-1602 und CID16020046 mit stimulierender bzw. antagonistischer Wirkung untersucht (69, 76).

### 2.3.2 Die GPR55 abhängige Signaltransduktion

Die von GPR55 aktivierten Signalwege wurden bisher in verschiedenen vitro Studien teils kontrovers diskutiert. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass GPR55 sowohl an  $G\alpha_{12,13}$  als auch  $Gq/11$  koppeln kann (Abb.2). Welcher Signalweg aktiviert wird, scheint dabei abhängig vom bindenden Liganden und der untersuchten Zelllinie zu sein (71). Nach Kopplung an  $G\alpha_{13}$  kommt es zu einer Aktivierung des RhoA/Rock (RhoA-assoziierte Proteinkinase) -PLC Signalwegs und über die Freisetzung von  $IP_3$  zu einer Ausschüttung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER (76, 80). Auch Lauckner et al. beschrieben einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach GPR55 Stimulation, der jedoch durch eine  $Gq$  und  $G12$  abhängige Aktivierung der PLC vermittelt wurde (79). Es wurde zudem dokumentiert, dass über eine GPR55 gesteuerte, intrazelluläre Kalziumerhöhung der Transkriptionsfaktor NFAT induziert werden kann (78, 80). In verschiedenen Zelltypen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass GPR55 infolge des RhoA/Rock Signallings die MAP-Kinase ERK aktivieren kann (77, 81, 82). Während dies von Oka et al. nur nach Stimulation mit LPI beobachtet wurde (83), zeigte sich in weiteren Studien auch nach Aktivierung von GPR55 mittels Cannabinoidliganden eine vermehrte Phosphorylierung von ERK (78, 81). Oka et al. demonstrierten zudem, dass über den RhoA/Rock Signalweg auch die MAP-Kinase p38 aktiviert wird (84). Somit gibt es Hinweise, dass die MAP-Kinasen ERK und p38, die zugleich im Kardiomyozyten zentrale Vermittler der LV Hypertrophie darstellen (17, 21), zu den potenziell durch GPR55 regulierten Proteinkinasen gehören.



### Abb. 2: Die GPR55 abhängige Signaltransduktion

GPR55 kann über Gα13 die RhoA-assoziierte Proteinkinase (RhoA/Rock) aktivieren, die sowohl zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPKs) als auch der Phospholipase C (PLC) führen kann. Letztere kann über die Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerin (DAG) eine Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER bewirken. Alternativ kann eine GPR55 Stimulation Gαq abhängig zur Aktivierung der PLC führen. Veränderte Darstellung nach: Liu et al., 2015 (85).

### 2.3.3 Kardiovaskuläre Funktionen von GPR55

In den vergangenen Jahren wurden vermehrt kardiovaskuläre Effekte von GPR55 und dessen Liganden beschrieben. Hierbei deuteten im Kontext hämodynamischer Regulation mehrere *in vitro* Studien eine Rolle von GPR55 in der Kontrolle des Gefäßtonus an. So beobachteten Daly et al. die Expression von GPR55 in allen drei Schichten arterieller Gefäße und dessen partielle Co-Expression mit vasomotorisch wirksamen α1-Adrenozeptoren (86). Initiale Vermutungen, dass vasodilatatorische Effekte von Cannabinoidliganden, denen keine Aktivierung von CB1- oder CB2-Rezeptoren zugrunde liegt, auf die Aktivierung von GPR55 zurückzuführen sind, bestätigten sich jedoch nicht (87). Indes führt die Stimulation von GPR55 mit LPI in Endothelzellen zu einer schnellen vorübergehenden Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration und transienter Hyperpolarisation sowie zur Vasodilatation isolierter Abgänge der Mesenterialarterien (88, 89). Eine derartige Modulation der Vasomotorik durch GPR55 könnte sich auf die kardiale Nachlast und somit auch auf das druckinduzierte Remodeling auswirken. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass GPR55 Einfluss auf die kardiale Funktion nehmen könnte. Diesbezüglich beschrieben Walsh et al., dass *Gpr55* KO Mäuse eine verminderte β-adrenerge Antwort auf Dobutamin zeigen (90), während in einer weiteren Studie eine positiv inotrope Antwort auf den α1-Agonist A61603 verstärkt war (91). Einen weiteren möglichen Mechanismus, durch den GPR55 die kardiale Kontraktilität beeinflusst, könnte eine Modulation der kardialen Ca<sup>2+</sup>

Homöostase darstellen. So wurde beobachtet, dass die Aktivierung von GPR55 auf neonatalen Kardiomyozyten einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. Die entsprechende Studie berichtete, dass dieser bei GPR55 Rezeptorexpression auf der Zellmembran sowohl aus dem Extrazellulärraum durch L-Typ Calcium Kanäle als auch IP3 vermittelt aus dem ER erfolgt, während es bei intrazellulärer Lage von GPR55 zur  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommt (92).

Ein Einfluss des Rezeptors auf den  $\text{Ca}^{2+}$  Haushalt konnte zudem bereits in Nervenzellen gezeigt werden. Dabei führte eine Aktivierung von GPR55 auf Dorsalganglienzellen großen Durchmessers im Rückenmark zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und erhöhter neuronaler Erregbarkeit (79). Eine nervale Expression von GPR55 ist nicht auf das Rückenmark beschränkt, sondern findet sich in weiten Teilen des zentralen Nervensystems, wie dem frontalen Kortex, Hypothalamus, Striatum und Hirnstamm. Somit ist der Rezeptor potenziell in zahlreiche neuronale und kognitive Funktionen involviert (93). Damit ist auch eine zentrale Regulation der Hämodynamik und neurohumoralen Aktivierung durch GPR55 nicht ausgeschlossen. Bezogen auf metabolische, kardiovaskuläre Risikofaktoren deutet die Expression von GPR55 im Hypothalamus darüber hinaus auf eine mögliche Rolle des Rezeptors in der Regulation der Nahrungsaufnahme hin (93). Meadows et al. fanden jedoch keine Veränderung der Energiezufuhr, aber einen Anstieg des Körperfettanteils bei verringerter spontaner Bewegungsaktivität in *Gpr55* defizienten Mäusen (*Gpr55* knock-out; KO) (94). Neben einem möglichen zentralen Einfluss auf die Energiebilanz sind direkte Effekte von GPR55 auf den peripheren Metabolismus etabliert. So fördert die Aktivierung von GPR55 die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas von Ratten und Mäusen (95). Weiterhin korrelierten in klinischen Studien in weiblichen Patientinnen erhöhte LPI Level im Plasma sowie eine hohe GPR55 Rezeptorexpression in viszeralem Fettgewebe mit Adipositas und einem erhöhten Körperfettanteil (96). Diese Daten deuten mögliche speziesbedingte Unterschiede an und unterstreichen zugleich eine Rolle von GPR55 im Metabolismus. Dabei wurde bisher noch nicht untersucht, ob auch das kardiale, metabolische Remodeling einer Regulation durch GPR55 unterliegt.

Es bestehen bereits Hinweise auf eine Rolle von GPR55 im Rahmen der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit. So konnten in humanem Plasma nach einem akuten Koronarsyndrom erhöhte LPI Level gemessen werden (97). Daneben werden im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen auch vermehrt Endocannabinoide produziert (70). Es wurde weiterhin gezeigt, dass GPR55 durch die Förderung der Efferozytose durch Makrophagen einen möglichen Vermittler der atheroprotektiven Effekte von Palmitoylethanolamid darstellt (98). Dies zeigt, dass GPR55 auch durch eine Beeinflussung inflammatorischer Reaktionen zur Modulation kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen könnte. Die GPR55 Expression in Knochenmark

und Milz sowie auf Leukozyten, einschließlich Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und neutrophilen Granulozyten, legt zudem eine Rolle des Rezeptors innerhalb des Immunsystems nahe (71, 99). Balenga et al. zeigten darüber hinaus, dass GPR55 in Interaktion mit dem CB2 Rezeptor eine zielgerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten bewirkt und zugleich die Degranulation und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vermindert (100). Auch eine verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus aktivierten Monozyten und NK-Zellen nach GPR55 Stimulation weist auf einen Einfluss des Rezeptors auf die angeborene Immunantwort hin (99). Weiterhin war eine *Gpr55* Deletion *in vivo* nach Myokardinfarkt mit einer Vermehrung proreparativer Makrophagen drei Tage nach Infarkt und einer gesteigerten Expression profibrotischer Faktoren assoziiert (101). Zusammenfassend könnte eine Rolle von GPR55 im pathologischen Remodeling sowohl eine Regulation der Hämodynamik und kardialen Funktion als auch eine Modulation metabolischer, inflammatorischer und fibrotischer Prozesse umfassen. Insbesondere konnten Puhl et al. bereits nachweisen, dass postischämisch im Mausmodell infolge einer *Gpr55* Deletion die Ausbildung einer kompensatorischen Hypertrophie beeinträchtigt und mit einer stärker ausgeprägten Infarktexpansion und Dilatation assoziiert ist (101). Dies deutet auf einen direkten Einfluss von GPR55 auf strukturelle Remodelingprozesse auch im Zuge einer Druckbelastung hin, der jedoch bisher unzureichend untersucht bleibt.

## 2.4 Zielsetzung der Dissertation

Die epidemiologische Bedeutung der hypertensiven Herzerkrankung unterstreicht die Notwendigkeit der Ermittlung neuer therapeutischer kardioprotektiver Möglichkeiten. Ein zentraler Mechanismus der hypertensiven Herzerkrankung ist die Aktivierung des RAAS, die zur Induktion des hypertrophen Remodelings führt. Das Cannabinoidsystem stellt hierbei einen potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt dar, der in den letzten Jahren bereits erfolgreich durch die Zulassung neuer Wirkstoffe in der Therapie nicht kardialer Erkrankungen wie Epilepsien sowie Spastiken im Rahmen einer Multiplen Sklerose genutzt werden konnte (102). Die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Rezeptors GPR55 wurde in diesem Zusammenhang bisher unzureichend untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, den Einfluss von GPR55 auf die AngII-induzierte Hypertrophie im Mausmodell zu analysieren. Dabei wurde der Schwerpunkt auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Beeinflusst GPR55 das Ausmaß struktureller und funktioneller Veränderungen im Zuge einer AngII-induzierten kompensierten Hypertrophie?
2. Interferiert GPR55 mit prohypertrophen adaptiven oder maladaptiven Signaltransduktionen in der AngII-induzierten Hypertrophie?
3. Beeinflusst GPR55 neben der Hypertrophie die Ausprägung maladaptiver Merkmale des AngII-induzierten Remodelings, einschließlich einer Modulation der  $\beta$ -adrenergen,

Kalzium-abhängigen und metabolischen Signaltransduktion sowie profibrotischer und proinflammatorischer Antworten?

### 3. Material

#### 3.1 Puffer und Lösungen

**Tab. 1: Puffer und Lösungen für die Probenaufbereitung zur Durchflusszytometrie**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Herz Verdaulösung	450 U/ml Kollagenase Typ I (C0130; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 125 U/ml Kollagenase Typ XI (C7657; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 60 U/ml DNase I (10104159001, Roche) 60 U/ml Hyaluronidase (H3506; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) PBS
Erythrolysepuffer	150 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 1 mM Triplex® III (EDTA Dinatriumsalz) 500 ml H <sub>2</sub> O pH 7,2
Fc Blockierlösung	1/10 000 antiCD16/32 in PBS
Durchflusszytometriepuffer	0,5% Bovines Serumalbumin (w/v) in PBS

**Tab. 2: Puffer für die Proteinisolation**

Puffer	Zusammensetzung
Standard Lysispuffer (vor Gebrauch frisch angesetzt)	500 mM HEPES, pH 7,4 200 mM Dithiothreitol 20 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , pH 7,4 1% Triton X-100 (v/v) 10% Glycerol (v/v) 500mM β-Glycerophosphat 1 Tablette auf 5ml: cOmplete™ mini protease-inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche)

**Tab. 3: Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer	10x Tris/glycine/SDS BIO-RAD, Hercules, USA

## Material

5xLaemmli Ladepuffer	62,5 mM Tris-HCL, pH 7,6 2% SDS (w/v) 5% $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) 50% Glycerol (v/v) 0,001% Bromphenolblau (w/v)
Transferpuffer	25 mM Tris-HCL 192 mM Glycin 20% Methanol (v/v)
TBS-Tween Lösung	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5 H <sub>2</sub> O 0,05% Tween 20 (v/v)

### 3.2 Kits

- RNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON Kanada)
- RT-Mix/PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)
- Total RNA KIT S-Line (Peqlab Erlangen, VWR, Radnor, USA)

### 3.3 Antikörper

**Tab. 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller
CD3	FITC	17A2	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD3	PB	17A2	BioLegend San Diego, USA
CD4	APC-H7	GK1.5	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD8a	PE-Cy7	53-6.7	Invitrogen, eBioscience, Waltham, USA
CD11b	APC	M1/70	Invitrogen, eBioscience, Waltham, USA
CD11b	PB	M1/70	BioLegend San Diego, USA
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BioLegend San Diego, USA
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	BioLegend San Diego, USA
CD11c	FITC	HL3	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD16/32		2.4G2	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD19	PE	eBio1D3	Invitrogen, eBioscience, Waltham, USA

## Material

CD45.2	BV510	104	BioLegend San Diego, USA
CD45.2	FITC	104	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD48	BV510	HM48-1	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
B220 (CD45R)	PB	RA3-6B2	BioLegend San Diego, USA
B220 (CD45R)	PE	RA3-6B2	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD62L	FITC	MEL-14	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
CD80	PerCP-Cy5.5	16-10A1	BioLegend San Diego, USA
CD115	APC	AFS98	Invitrogen, eBioscience, Waltham, USA
CD206	PE	C068C2	BioLegend San Diego, USA
F4/80	APC	BM8	BioLegend San Diego, USA
F4/80	PB	BM8	BioLegend San Diego, USA
F4/80	PE	BM8	BioLegend San Diego, USA
Ly6C	BV421	HK1.4	BioLegend San Diego, USA
Ly6C	PE-Cy7	AL-21	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
Ly6G	APC-Cy7	1A8	BioLegend San Diego, USA

Tab. 5: Primärantikörper zur Proteindetektion im Western Blot

Protein	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
pAKT (Ser473) (60 kDa)	Polyklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
AKT (60 kDa)	Polyklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
AT1R	Polyklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
pAMPK $\alpha$ (Thr172)	Monoklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
CAMKII	Monoklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Calcineurin A	Polyklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
Calmodulin	Polyklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
CD36	Monoklonaler AK	IgG Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
CPT1A	Monoklonaler AK	IgG Maus	1:1000	Abcam Cambridge, UK

## Material

CPT1B	Polyklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Abcam Cambridge, UK
pERK 42/44 (Thr202/Tyr204) (42/44 kDa)	Monoklonaler AK	IgG	Maus	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
ERK 42/44 (42/44 kDa)	Monoklonaler AK	IgG	Maus	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
GLUT4	Monoklonaler AK	IgG	Maus	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
IGF-1 Rezeptor $\beta$ (95 kDa)	Polyklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
pIRS-1 (Ser612)	Polyklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
PI3 Kinase p110 $\alpha$ (110 kDa)	Monoklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
PI3 Kinase p110 $\gamma$ (110 kDa)	Monoklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
P-p38 (Thr180/Tyr182) (43 kDa)	Polyklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main
p38 (40 kDa)	Polyklonaler AK	IgG	Kaninchen	1:1000	Cell signaling, Frankfurt am Main

Tab. 6: Sekundäntikörper zur Proteindetektion im Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell signaling, Frankfurt am Main
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell signaling, Frankfurt am Main

## 3.4 qPCR Primer und Sonden

Tab. 7: qPCR Primer von MWG (Eurofins Genomics)

Gen	NCBI Zugangsnummer	Primer und Sonden-Sequenz
<i>Ccl2</i>	NM_009915	Fw: GAGCATCCACGTGTTGGCT Rev: TGGTGAATGAGTAGCAGCAGGT P: FAM-AGCCAGATGCAGTTAACGCCCCACT-TAMRA

Forward/Vorwärts (Fw); Reverse/Rückwärts (Rev), Probe/Sonde (P)

Tab. 8: qPCR Primer von Life Technology (TaqMan Sonden)

Gen	NCBI Zugangsnummer	Katalognummer
<i>Agtr1a</i>	NM_177322.3	Mm00616371_m1

## Material

<i>Col1a2</i>	NM_007743.2	Mm00483888_m1
<i>Col3a1</i>	NM_009930.2	Mm01254476_m1
<i>Ctgf</i>	NM_010217.2	Mm01192933_g1
<i>Cd36</i>	NM_001159555.1	Mm01135198_m1
<i>Gapdh</i>	NM_001289726.1	Mm99999915_g1
<i>Gata4</i>	NM_008092.3	Mm00484689_m1
<i>Gpr55</i>	NM_001033290.2	Mm02621622_s1
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	NM_008361.3	Mm00434228_m1
<i>Il-6</i>	NM_031168.1	Mm00446190_m1
<i>Il1ng</i>	NM_008337.3	Mm01168134_m1
<i>Mef2c</i>	NM_001170537.1	Mm01340842_m1
<i>Mmp-2</i>	NM_008610.2	Mm00439498_m1
<i>Myc</i>	NM_001177352.1	Mm00487804_m1
<i>Nfatc3</i>	NM_010901.2	Mm01249200_m1
<i>Nfatc4</i>	NM_001168346.1	Mm00452375_m1
<i>Nppa</i>	NM_008725.2	Mm01255747_g1
<i>Nppb</i>	NM_008726.5	Mm01255770_g1
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904.2	Mm00447181_m1
<i>Tgf-1<math>\beta</math></i>	NM_011577.1	Mm01178820_m1
<i>Tnfa</i>	NM_013693.3	Mm00443258_m1
<i>Myh6</i>	NM_001164171.1	Mm00440359_m1
<i>Adrb1</i>	NM_007419.2	Mm00431701_s1
<i>Myh7</i>	NM_080728.2	Mm00600555_m1

### 3.5 Weitere Materialien

**Tab. 9: Verwendete Chemikalien nach alphabetischer Reihenfolge**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Angiotensin II human ≥93% (HPLC)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
Beads UltraCompensationBeads	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

## Material

Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica	Heidelberg
Chloroform	Supelco	Bellefonte, USA
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Entellan	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Eosin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycerol	Merck	Darmstadt
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Isopropanol	SAV	Flintsbach am Inn
Isotonische Kochsalzlösung (0,9%)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Ketamin	Serumwerk Bernburg AG	Bernburg
Meloxicam	Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Dulbecco)	Biochrom GmbH	Berlin

## Material

Ponceau S	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Salzsäure	Merck	Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Triplex® III	Merck	Darmstadt
Tris-HCL	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Triton X-100	AppliChem	Darmstadt
Trizol	VWR	Radnor, USA
Tween20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ringerlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg
Xylazin	Serumwerk Bernburg AG	Bernburg
Xylol	Honeywell	Charlotte, USA

Weitere, in dieser Arbeit verwendete Materialien sind im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode unter 4. Methoden aufgeführt.

**Tab. 10: Verwendete Geräte nach alphabetischer Reihenfolge**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
FACSCanto™ II	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Fusion Solo S System	Vilber Lourmat	Eberhardzell
Isofluran Vaporizer	Völker GmbH	Kaltenkirchen
Heizplatte Tempcontrol 37	Zeiss	Oberkochen
Histokinette ASP200S	Leica Biosystems	Wetzlar
NanoPhotometer®	Implen GmbH	München
Paraffin Dispenser EG1150 H	Leica Biosystems	Wetzlar
Pierce Power Blotter	Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Power Lab Einheit	ADInstruments Ltd	Oxford, UK

## Material

PowerPac™ Basic power supply	BIO-RAD	Hercules, USA
Tecan Safire II	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
ThermoMixer® F1.5	Eppendorf AG	Hamburg
TissueLyser LT	QIAGEN GmbH	Hilden
Vevo 3100	FUJIFILM VisualSonics	Toronto, Kanada
7900 HTFast Real-Time PCR System	Applied Biosystems™	Waltham, USA

Weitere, in dieser Arbeit verwendete Geräte sind im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode unter 4. Methoden aufgeführt.

### 3.6 Computersoftware

- Fiji (ImageJ) (103)
- GraphPadPrism (GraphPad Software Version 7, San Diego, CA USA)
- Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences – GmbH, Lincoln, NE USA)
- LAS V4.3 (Leica Biosystems, Wetzlar)
- SDS 2.4 (Applied Biosystems™, Schwerte)
- Vevo Lab Software 8 (FUJIFILM VisualSonics, Amsterdam, Niederlande)

## 4. Methoden

### 4.1 Mausmodell

#### 4.1.1 Studienpopulation

Für die Studie wurden global *Gpr55* defiziente Mäuse (*Gpr55* knock-out; KO) auf dem Hintergrund von C57BL/6J Mäusen und als Kontrollgruppe gezüchtete Wildtyp (WT) Mäuse verwendet. Die *Gpr55* KO Mäuse wurden initial über das Helmholtz Zentrum München vom Europäischen Maus-Mutanten Archiv erworben. Hier wurde zur Generierung der globalen Defizienz die *Gpr55* codierende Exonsequenz durch Insertion einer Selektionskassette in embryonalen Stammzellen deletiert. Nach Kontrolle des Erfolgs der Deletion wurden die so gewonnenen Stammzellen in Blastozysten eingesetzt. Aus diesen konnten chimäre Mäuse generiert werden, die dann auf C57BL/6J Wildtyp Mäuse zurückgekreuzt (Internationale Stammbezeichnung: B6; 12955-*Gpr55*<sup>tm1Lex/leg</sup>) wurden. So entstehen heterozygote und durch deren Kreuzung homozygote *Gpr55* defiziente Mäuse. Die homozygot *Gpr55* defizienten Tiere zeigten keine Zeichen von Unfruchtbarkeit, vorzeitiger Mortalität oder Entwicklungsstörungen. Nach Erhalt der *Gpr55* KO Mäuse erfolgte die Zucht dieser transgenen Linie in der Zentralen Versuchstierhaltung des Klinikums der Universität München – Campus Innenstadt. Es wurden weibliche und männliche Mäuse in die Studie eingeschlossen. Vor Einschluss in den Versuch wurden alle Mäuse genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR (polymerase chain reaction) Amplifikation einer 422 bp langen Region des WT Allels und einer 301 bp langen Region des KO Allels. Alle Tierversuche wurden gemäß der 2010/63/EU Richtlinien und der Vorgaben der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen ROB-55.2.2532.Vet\_02-13-176 und 18-114) durchgeführt.

#### 4.1.2 Hypertrophie Modell

Um die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Lipidrezeptors GPR55 in der druckinduzierten Hypertrophie zu untersuchen, wurden 8 Wochen alte globale *Gpr55* KO und WT Mäuse einer kontinuierlichen AngiotensinII (AngII; 1 µg/kg/min gelöst in Ringerlösung) oder Vehikel (Ringerlösung) Infusion über osmotische Minipumpen (Micro-osmotic pumps Alzet, Model 1004) unterzogen. Nach 28-tägiger Infusion wurde der Phänotyp morphologisch, funktionell und molekularbiologisch charakterisiert.

##### 4.1.2.1 Pumpenvorbereitung und Implantation

Zunächst wurden die osmotischen Minipumpen, über die die AngII oder Vehikel Infusion verabreicht wurde, befüllt und implantiert. Die Pumpen des Modells 1004 der Firma ALZET verfügen über eine kontinuierliche Pumprate von 0,11 µl/h. Um eine einheitliche Infusionsrate von 1 µg/kg/min zu ermöglichen, wurde für jede Maus die AngII Konzentration nach Körpergewicht

berechnet und die kalkulierte AngII Menge in Ringerlösung suspendiert. Die Pumpen wurden 24 h vor Implantation unter sterilen Bedingungen luftfrei befüllt, in ein 15 ml Falcon mit 8 ml 0,9% isotonischer NaCl Lösung gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden die Pumpen vorab aktiviert und so eine von Beginn an kontinuierliche Pumprate ab Implantation *in vivo* gewährleistet. Den Mäusen wurden zur Analgesie 0,2 mg/kg Meloxicam prä-operativ subkutan gespritzt. Zur Narkose wurde ein Isofluran Verdampfer verwendet. Nach Einleitung der Anästhesie in einer Induktionskammer mit 4% Isofluran/96% O<sub>2</sub> wurde diese über eine Mund-Nasen Maske mit 2-3% Isofluran/97-98% O<sub>2</sub> bei einer Flussrate von 1 l/min während des Eingriffes fortgeführt. Um während des gesamten Eingriffes eine Hypothermie der Tiere zu vermeiden, wurden diese mit Leukoplaststreifen auf einer 37°C warmen Heizplatte fixiert. Zur Implantation wurde ein 0,3-0,4 cm großer Hautschnitt in Höhe des linken Schulterblattes gesetzt und stumpf eine subkutane Tasche bis zur rechten Flanke präpariert. Die Pumpe wurde mit der permeablen Membran voran in die Tasche eingeführt. Dabei gewährleistete die Tiefe der Tasche, dass die Pumpe subkutan beweglich blieb und somit einer Gewebeerkrankung der Pumpe und Störungen der Mobilität der Maus vorgebeugt wurden. Im Anschluss wurde der Schnitt durch Einzelknopfnähte mit nicht resorbierbarem Faden (SERAFLEX®, 50 cm, Stärke 5, schwarz; SERAG WIESSNER) verschlossen. Die Dauer des Eingriffes betrug etwa zehn Minuten mit geringer Belastung für die Tiere. Nach der Abnahme der Nasenmaske konnte ein rasches Abatmen der Narkose und unmittelbare Aufnahme des Spontanverhaltens der Mäuse beobachtet werden. Postoperativ wurden die Tiere engmaschig bis zum Versuchsende auf Auffälligkeiten hin kontrolliert.

## **4.2 Physiologische Messungen**

### **4.2.1 Echokardiographie**

Nach 28 Tagen kontinuierlicher AngII bzw. Vehikel Infusion wurden zur Analyse der strukturellen LV Hypertrophie und der kardialen Funktion echokardiographische Aufnahmen (Vevo 3100, Toronto, Kanada) der Herzen von KO und WT Mäusen angefertigt. Dafür wurde die Narkose in einer Induktionskammer mit 4% Isofluran/96% O<sub>2</sub> eingeleitet und über eine Mund-Nasen Maske mit 1,5% Isofluran/98,5% O<sub>2</sub> während der Untersuchung aufrechterhalten. Die Flussrate betrug 1 l/min. Um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten und konstante Vitalparameter zu gewährleisten, wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte platziert und mit einer Rotlichtlampe bestrahlt. Zur Überwachung der Körpertemperatur wurde diese zudem über eine rektale Sonde gemessen. Die Mäuse wurden mit den Pfoten auf den mit Elektrodengel beschichteten EKG Elektroden mittels Leukoplaststreifen fixiert, um EKG und Herzfrequenz aufzuzeichnen. Anschließend wurde das Fell der präkordialen Region mithilfe von Enthaarungscreme (Asid-med; ASID BONZ GmbH, Herrenberg) entfernt.

Nach Auftragen von Ultraschallgel wurden die Aufnahmen unter Benutzung eines Sektorschallkopfs angefertigt. Zunächst wurde die parasternale mittventrikuläre Längsachse aufgesucht. Die richtige Position wurde durch Ausrichten von Apex und Aortenklappe in einer Linie und nach Sichtbarkeit und Form der Papillarmuskeln eingestellt. Es erfolgte eine B-Mode Aufnahme, das heißt eine zweidimensionale Abbildung des Herzens, sowie eine M-Mode Projektion, entsprechend einer eindimensionalen Darstellung aller reflektierten Signale an einer definierten Achse im Zeitverlauf. Diese wurde an der breitesten Stelle des linken Ventrikels an der Spitze des posterioren Papillarmuskels durchgeführt. Danach wurde der Schallkopf um 90 Grad gedreht, um die mittventrikuläre Kurzachse, ebenfalls in B-Mode und M-Mode, aufzunehmen.

Die Aufnahmen wurden in der Vevo® Lab Software vermessen. Dabei wurden in den M-Mode Aufnahmen der Längsachse in drei Herzzyklen jeweils in Enddiastole und Endsystole die Dicken des interventrikulären Septums (Interventricular septum; diastolisch/systolisch; IVS;d/s) und der LV Hinterwand (Left ventricular posterior wall; diastolisch/systolisch; LVPW;d/s) sowie der LV Durchmesser (Left ventricular internal diameter; diastolisch/systolisch; LVID;d/s) gemessen. Nach demselben Prinzip wurde die Dicke der LV Vorderwand (Left ventricular anterior wall; diastolisch/systolisch; LVAW;d/s) in der M-Mode Aufnahme der Kurzachse bestimmt. Durch die Vevo® Lab Software wurden anhand der jeweils gemessenen Werte und den unten aufgeführten Gleichungen zusätzlich das enddiastolische und endsystolische Volumen (Left ventricular volume; diastolisch/systolisch LVvol;d/s), die LV Masse und die funktionellen Parameter Verkürzungsfraktion (Fractional shortening; FS) und Ejektionsfraktion (EF) berechnet. Aus dem so errechneten Volumen und der aufgezeichneten Herzfrequenz (Heart rate; HR) konnten Schlagvolumen (SV) und Herzzeitminutenvolumen (Cardiac output; HMV) kalkuliert werden.

$$\text{LV Masse [mg]} = 1,053 \text{ mg/ml} \times ((\text{IVS;d} + \text{LVID;d} + \text{LVPW;d})^3 - \text{LVID;d}^3)$$

$$\text{Korrigierte LV Masse [mg]} = \text{LV Masse} \times 0,8$$

$$\text{LV Vol;d [\mu l]} = \frac{7,0}{2,4 + \text{LVID;d}} \times \text{LVID;d}^3$$

$$\text{LV Vol;s [\mu l]} = \frac{7,0}{2,4 + \text{LVID;s}} \times \text{LVID;s}^3$$

$$\text{FS [\%]} = \frac{\text{LVID;d} - \text{LVID;s}}{\text{LVID;d}} \times 100$$

$$\text{EF [\%]} = \frac{\text{LV Vol;d} - \text{LV Vol;s}}{\text{LV Vol;d}} \times 100$$

$$\text{SV [\mu l]} = \text{LV Vol;d} - \text{LV Vol;s}$$

$$\text{CO [ml]} = \text{SV} \times \text{HR}$$

#### 4.2.1.1 Dobutamin Stress-Echokardiographie

Zur Messung der kardialen Reserve und der sympathoadrenergen Antwort wurden zudem echokardiographische Aufnahmen nach Gabe eines sympathischen Stimulus, wie von Puhl et al. beschrieben, aufgezeichnet (104). Es wurden zunächst basale Aufnahmen angefertigt und danach 0,75 µg/g Dobutamin in NaCl intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Anschließend wurden kontinuierlich bei jeder zu verzeichnenden Erhöhung der Herzfrequenz bis zu deren Rückgang durch eine Verstoffwechslung des Dobutamins B- und M-Mode Aufnahmen des Herzens aufgezeichnet. Ausgewertet wurden jeweils die Aufnahme der maximal positiv chronotropen Antwort nach Dobutamin Injektion sowie die basale Aufnahme unmittelbar vor Injektion. Dabei wurden die Wanddicken und LV Durchmesser, wie unter 4.2.1 beschrieben, ausgemessen und die kardiale Funktion bestimmt.

#### 4.3 Organentnahme und Aufbewahrung bis zur weiteren Prozessierung

Die Euthanasie und Dissektion der Tiere erfolgte nach 28 Tagen kontinuierlicher AngII bzw. Vehikel Infusion. Die *Gpr55* KO und WT Mäuse wurden zunächst gewogen und mit einer i.p. verabreichten Überdosis von Ketamin/Xylazin (100 µg/g Körpergewicht Ketamin; 10 µg/g Körpergewicht Xylazin) euthanasiert. Nach Eröffnen von Bauchraum und Brustkorb wurde zuerst das perikardiale Fettgewebe vorsichtig isoliert, gewogen und in PBS auf Eis überführt. Anschließend wurde aus dem rechten Ventrikel unter Verwendung von 23 G Nadeln (Microlance 3 Needles Blue; BD, Franklin Lakes, USA) Blut in EDTA gespülte 1 ml Spritzen abgenommen und in mit EDTA beschichtete Röhrchen (Micro tube 1.3 ml K3E; Sarstedt) gegeben. Nach Einschneiden des rechten Vorhofes wurden 10 ml PBS in den linken Ventrikel gespritzt, um den großen Kreislauf zu perfundieren und weitestgehend von Erythrozyten zu befreien. Nach Explantation des Herzens wurden die Vorhöfe abgetrennt und Vorhöfe und Ventrikel gewogen. Eine etwa 1 mm breite mittventrikuläre Scheibe wurde zur Weiterverarbeitung entweder in PBS auf Eis für die Durchflusszytometrie oder in 4% Paraformaldehyd für die Histologie gegeben. Das verbleibende Gewebe, also Apex und Basis des Herzens, wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für molekularbiologische Analysen gelagert. Die Milz wurde explantiert, horizontal geteilt, gewogen und eine Hälfte in PBS auf Eis für die Durchflusszytometrie gegeben. Lunge und Leber wurden entnommen, gewogen und zum Trocknen aufbewahrt. Beide Femurknochen sowie eine Tibia wurden abgetrennt und gesäubert. Die Länge der Tibia wurde mit einem Messschieber bestimmt. Das Herzgewicht wurde jeweils auf die Tibialänge und das Körpergewicht normalisiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Trockengewichte von Lunge und Leber gemessen. Durch den Vergleich von Nass- und Trockengewichten ist es möglich das im Gewebe eingelagerte Wasser abzuschätzen und so Ödeme zu detektieren.

## 4.4 Blutzuckerbestimmung

Um einen möglichen Einfluss der *Gpr55* Deletion auf den Blutzuckerspiegel aufzudecken, wurde dieser in naiven, 12 Wochen alten *Gpr55* KO und WT Mäusen bestimmt. Dafür wurde in der inaktiven Tagesphase 6 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme nach Genickbruch der Tiere mittels Schwanzinzision eine Blutprobe gewonnen. In dieser wurde mittels Accu-check Aviva Glukometer (Roche, Basel, Schweiz) der Blutzuckerwert gemessen.

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht es, verschiedene Zellpopulationen in einem Gewebe zu detektieren und zu charakterisieren. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die zelluläre Immunantwort infolge der 28-tägigen AngII Infusion im Vergleich zur Vehikel Infusion in *Gpr55* KO und WT Mäusen zu untersuchen. Dabei wurden die Immunzellpopulationen in Herz, perikardiales Fett sowie in Milz, Knochenmark und Blut analysiert. Zunächst wurden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt. Danach wurden sie mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, die gegen zelluläre Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome können durch Laser bestimmter Wellenlängen angeregt werden und emittieren daraufhin Licht spezifischer Wellenlängen, das von Detektoren erkannt wird. Zudem wird das emittierte Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht detektiert, wodurch Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden können.

#### 4.5.1.1 Zellvereinzelung

Nach Organentnahme wurden je Tier eine mittventrikuläre Herzscheibe, eine halbe Milz und das perikardiale Fett gewogen und in PBS gegeben. Daneben wurden das Knochenmark beider Femurknochen sowie 50 µl EDTA Blut verarbeitet. Im Folgenden sind die zur Zellvereinzelung vorgenommenen Schritte für die genannten Gewebe aufgeführt. Alle Zentrifugationsschritte, außer anders vermerkt, erfolgten bei 300 g für 5 min bei 4°C.

##### Herz und perikardiales Fett

Zunächst wurde das Herz- bzw. Fettgewebe mit einer Mikroschere in ca. 1x1 mm große Stückchen geteilt und zum enzymatischen Verdau mit 1 ml Verdaulösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Verbleibende Gewebestückchen wurden danach mechanisch durch Trituration mit einer 1 ml Pipette gelöst. Zur Aufreinigung wurden die Proben durch einen Zellfilter (70 µm, Corning, New York, USA) gegeben und mit 5 ml Durchflusszytometriepuffer nachgespült. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 500 µl Durchflusszytometriepuffer resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension in ein FACS Röhrchen (Corning, New York, USA) überführt.

### Milz

Zur Zerkleinerung wurden die Milzen mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch einen Zellfilter mit 70 µm Porengröße gedrückt und mit 5 ml Durchflusszytometriepuffer nachgespült. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet zur Erythrozytenlyse in 1 ml Erythrolysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde anschließend zweimal zu den Proben je 1 ml Durchflusszytometriepuffer zugegeben und der Überstand nach Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Durchflusszytometriepuffer aufgelöst und 50 µl der Suspension in ein FACS Röhrchen überführt.

### Knochenmark

Die Markhöhle des Femurs wurde am kaudalen Ende vorsichtig eröffnet und der Knochen in einer 1 ml Pipettenspitze in einem Reaktionsgefäß platziert. Dadurch konnte das Knochenmark durch die Öffnung der Pipettenspitze aus dem Femur abzentrifugiert (2 min; 9000 g) werden. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Knochenmark in 1 ml Erythrolysepuffer resuspendiert, zentrifugiert und mit 1 ml Durchflusszytometriepuffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl Durchflusszytometriepuffer gelöst. Anschließend wurden 50 µl der Suspension in ein FACS Röhrchen überführt.

### Blut

Zu 50 µl EDTA Vollblut auf Eis wurde in einem FACS Röhrchen für 10-15 min 1 ml Erythrolysepuffer zugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach Zentrifugation, Zugabe von 1 ml Durchflusszytometriepuffer und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen.

#### **4.5.1.2 Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen**

Um bei der sich anschließenden Färbung der Immunzellmarker mit spezifischen Antikörpern unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden zunächst die Fc-Rezeptoren der Zellen blockiert. Hierzu wurde nach Transfer von 50 µl der jeweiligen Zellsuspensionen in ein FACS Röhrchen 50 µl einer CD16/32 Blockierlösung zugegeben. Zu den nicht-resuspendierten Blutzellen wurden ebenfalls 50 µl Blockierlösung direkt in die FACS Röhrchen gegeben. Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **4.5.1.3 Färbung der Oberflächenantigene**

Zu den mit 50 µl Blockierlösung versetzten Proben wurde anschließend zur Färbung von Immunzellmarkern 50 µl Antikörper (AK) Mischung hinzugefügt und die Proben für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zur Identifikation verschiedener Immunzellpopulationen wurden die

unter 4.5.1.3.1. aufgelisteten Antikörperkombinationen, sogenannte Antikörperpanel, angewendet. Nach der Inkubation mit der AK Mischung wurden 500 µl Durchflusszytometriepuffer auf die Proben gegeben, diese zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 300 µl Durchflusszytometriepuffer resuspendiert. Im Anschluss wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen.

#### 4.5.1.3.1 Antikörper Panel für die Durchflusszytometrie

**Tab. 11: Antikörper Panel für die Durchflusszytometrie**

<b>Blut/Milz/Knochenmark Panel</b>		
<b>Antikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Konzentration</b>
CD45.2	FITC	1/1000
CD11b	PercP-cy5.5	1/500
CD115	APC	1/500
Ly6G	APC-Cy7	1/500
Ly6C	PE-Cy7	1/1000
F4/80	PE	1/500
<b>Herzpanel</b>		
<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>Konzentration</b>
CD45.2	BV510	1/500
CD11b	PE-Cy7	1/500
Ly6G	APC-Cy7	1/500
Ly6C	BV421	1/500
F4/80	APC	1/500
CD206	PE	1/200
CD11c	FITC	1/500
CD80	PercP-cy5.5	1/200
<b>Perikardiales Fett Panel 1: Myeloide Zellen</b>		
<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>Konzentration</b>
CD45.2	BV510	1/500
CD11b	APC	1/200
CD19	PE	1/500
Ly6G	APC-Cy7	1/500
Ly6C	PE-Cy7	1/500
F4/80	PB	1/500
CD11c	FITC	1/500
<b>Perikardiales Fett Panel 2: Lymphozyten</b>		
<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>Konzentration</b>
CD3	PB	1/500
CD4	APC-Cy7	1/500
CD8a	PE-Cy7	1/500
B220	BV510	1/1000

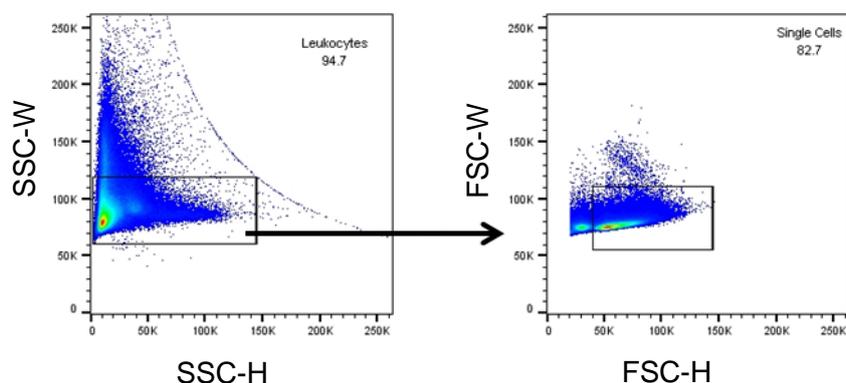
#### 4.5.1.4 Durchflusszytometrische Detektion der Zellen

Im Anschluss an die Probenvorbereitung erfolgte die Detektion der Immunzellen an zwei verschiedenen Durchflusszytometern (FACSCanto™ II, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) unter Verwendung der BD FACSDiva™ Software. Dabei kam ein Durchflusszytometer mit einem blauen und einem roten Laser der Wellenlängen 488 nm und 633 nm sowie zwei Detektoren für die Lichtstreuung und sechs Farbdetektoren zum Einsatz, die die Diskrimination von sechs verschiedenen Fluoreszenzsignalen ermöglichen. Mit diesem wurden die Leukozytenzahlen in Blut, Milz und Knochenmark gemessen. Die Dauer der Messung betrug je Probe 1 min bei einer Flussrate von 90 µl/min. Das zweite Durchflusszytometer war mit einem zusätzlichen violetten Laser der Wellenlänge 405 nm und zwei zusätzlichen Farbdetektoren ausgestattet. Dadurch konnten parallel acht verschiedene Emissionsspektren detektiert werden. Damit erfolgte die Analyse der Zellzahlen im Herz und perikardialen Fettgewebe. Da diese Gewebe im Gegensatz zu den Organen des hämatopoetischen Systems eine geringere Leukozytenzahl aufweisen, wurde eine verlängerte Messdauer von 2 min bei einer Flussrate von 90,5 µl/min gewählt.

#### 4.5.1.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Zur Auswertung der Daten wurde die FlowJo Software verwendet. Zuvor wurde für jedes Panel eine Kompensation erstellt, um Überlappungen der Emissionsspektren einzelner Fluorochrome zu korrigieren. Dafür wurden Zellsuspensionen analysiert, die mit nur einem Antikörper gefärbt wurden und sowohl positive als auch negative Zellen für den jeweiligen Antikörper enthielten. Im Falle einer sehr kleinen, Antikörper bindenden Zellpopulation und damit einem sehr schwachen positiven Signal wurden Antikörper bindende Partikel, sogenannte Beads, verwendet. Dabei werden anstelle von Zellpopulationen die mit dem Antikörper gefärbten Beads von ungefärbten Beads abgegrenzt. Anhand der einfach gefärbten Proben konnte durch die Software bestimmt werden, inwieweit die Emissionsspektren einzelner Fluorochrome von den Detektoren erfasst werden und so eine Kompensationsmatrix errechnet werden. Anhand der kompensierten Fluoreszenzsignale konnte dann eine Selektion einzelner Zellpopulationen, das sogenannte Gating, vorgenommen werden. Dabei wurde die in Tab. 12 und Tab. 13 bzw. Abb. 3-8 aufgeführte Gating Strategie angewandt. Dazu werden jeweils zwei Parameter in einem zweidimensionalen Diagramm (Dot Plot) gegeneinander aufgetragen, wobei jedes Ereignis bzw. jede Zelle einen Punkt darstellt. Zusammenliegende Zellen können dann als Population definiert und in zusätzlichen Dot Plots durch die Anwendung weiterer Parameter näher charakterisiert und in Subpopulationen aufgeteilt werden. Bei jedem Gating wurden in den ersten Schritten Zellaggregate und -debris ausgeschlossen (Abb. 3). Dafür wurden die Pulsweite (side scatter pulse width; SSC-W) und die Pulshöhe des Seitwärtsstreulichts (side scatter pulse height; SSC-H) bzw. des Vorwärtsstreulichts (forward side scatter pulse width; FSC-W/ forward side

scatter pulse height; FSC-H) im Dot Plot gegeneinander aufgetragen und Ereignisse mit zu hohen Werten herausgefiltert. Bei schwer abzugrenzenden Zellpopulationen wurden zudem FMO (Fluorescence minus one) Kontrollen angefertigt, die alle Antikörper eines Panels bis auf den, der den schwer abzugrenzenden Zelltyp detektiert, enthalten. Durch den Vergleich mit vollständig gefärbten Proben kann so ein positives Signal von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden. Nach Abschluss des Gatings wurde die Zellzahlen exportiert und auf die jeweilige Bezugsgröße (1mg Organ/1 Femur/1 ml Blut) hochgerechnet.



**Abb. 3: Gating Strategie zum Ausschluss von Zellaggregaten und -debris**  
Gating von SSC-W gegen SSC-H und FSC-W gegen FSC-H und Ausschluss von Zellen mit zu hohen Signalwerten

**Tab. 12: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für myeloide Zellen**

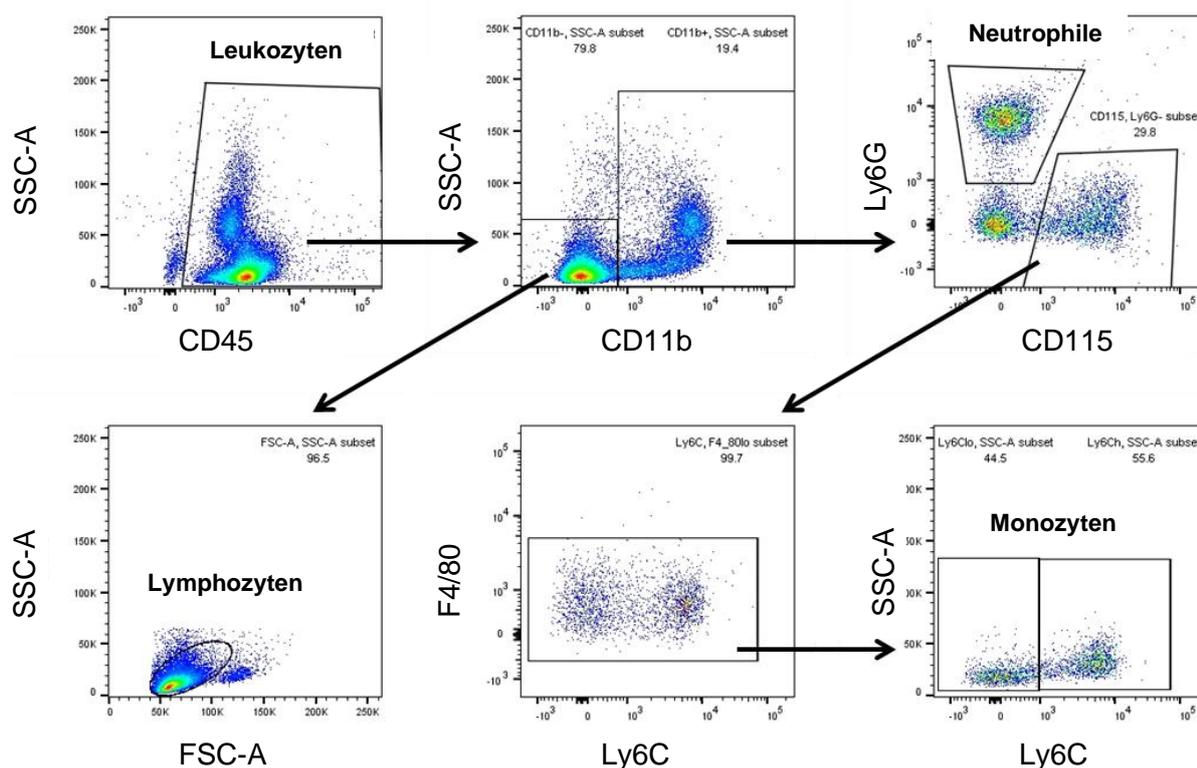
Gating Strategie Myeloide Zellen							
Zelltyp	Oberflächenmarker						
<b>Gating aller myeloiden Panel</b>							
Leukozyten	CD45+						
Lymphozyten	CD45+	CD11b-					
Neutrophile Granulozyten	CD45+	CD11b+	Ly6G+				
Makrophagen	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80+			
Monozyten	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80-	CD115+ <sup>1</sup>		
Klassische Monozyten	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80-	CD115+ <sup>1</sup>	Ly6C high	
Nichtklassische Monozyten	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80-	CD115+ <sup>1</sup>	Ly6C low	
<b>Zusätzliches Gating von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen im Herz</b>							
Dendritische Zellen	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80-			CD11c+
CD206+ Makrophagen	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80+	CD206+		

Intermediäre Monozyten	CD45+	CD11b+	Ly6G-	F4/80-	Ly6C intermediär		
------------------------	-------	--------	-------	--------	------------------	--	--

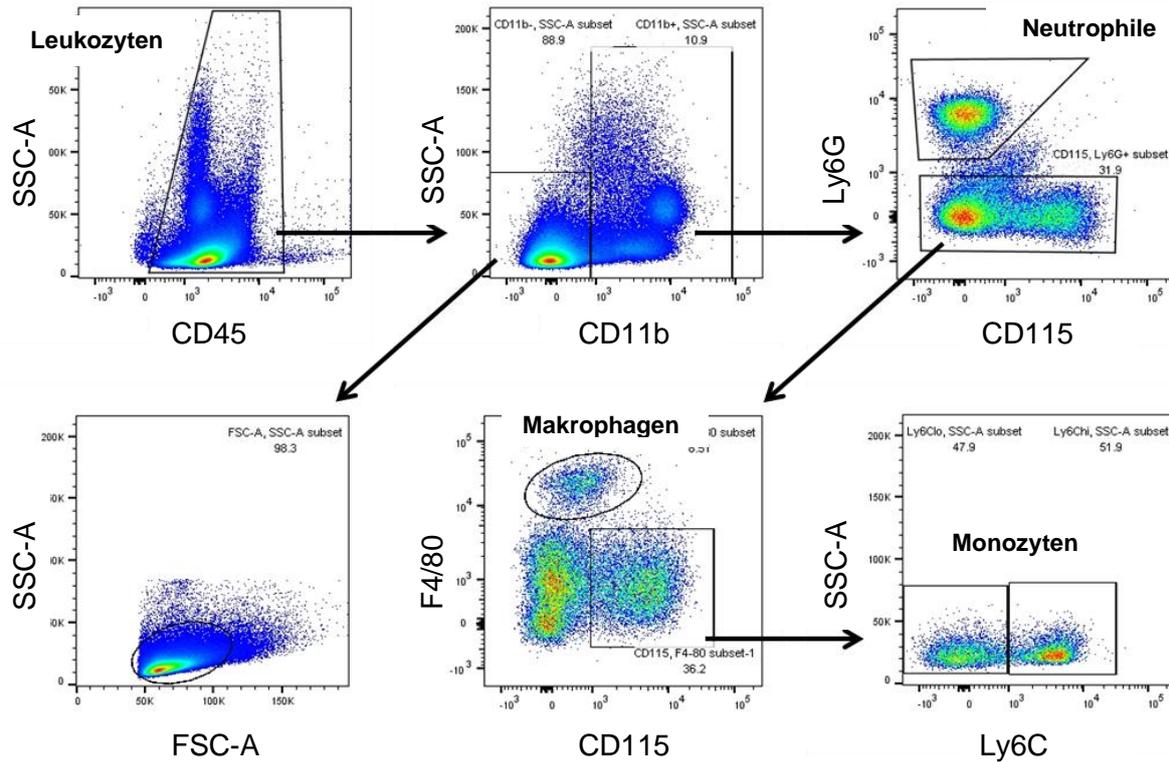
<sup>1</sup>CD115+ wurde nur in Blut-/Milz-/Knochenmarkpanel eingesetzt.

**Tab. 13: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für lymphozytäre Zellen**

Gating Strategie Lymphozyten				
Zelltyp	Oberflächenmarker			
<b>Gating von B-Zellen im perikardialen Fett</b>				
B-Zellen	CD45+	CD11b-	CD19+	
<b>Gating von T-Zellen im perikardialen Fett</b>				
T-Zellen	CD3+			
T <sub>helper</sub> - Zellen	CD3+	CD4+	CD8-	
Zytotoxische T-Zellen	CD3+	CD4-	CD8+	

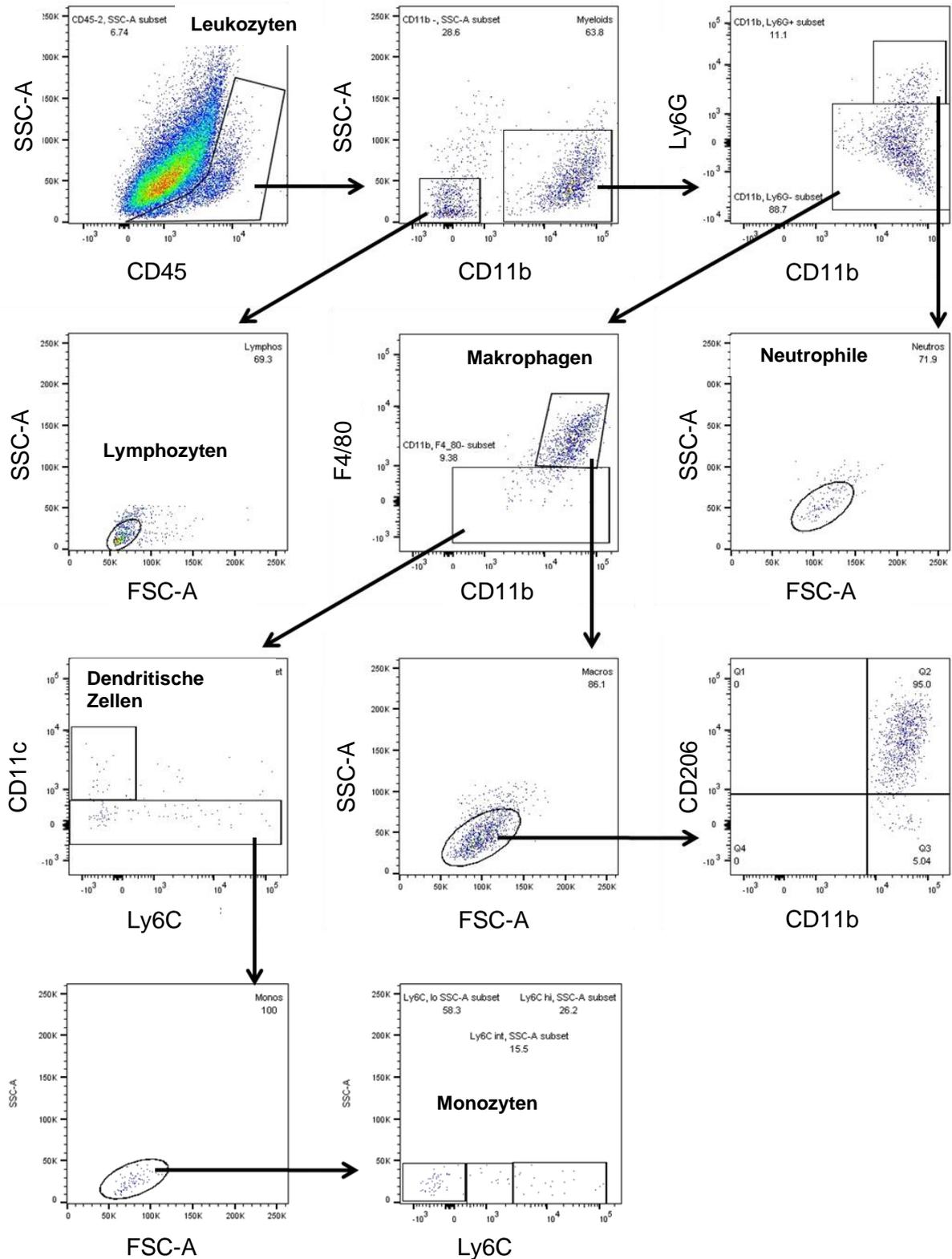


**Abb. 4: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im Blut**  
 Identifizierung von Leukozyten als CD45+; Auftrennung in CD11b- Lymphozyten und CD11b+ myeloide Zellen; Unterteilung der CD11b+ Zellen in Ly6G+ Neutrophile und Ly6G- CD115+ F4/80- Monozyten; Einteilung der Monozyten in klassische und nichtklassische Monozyten anhand der Ly6C Expression.

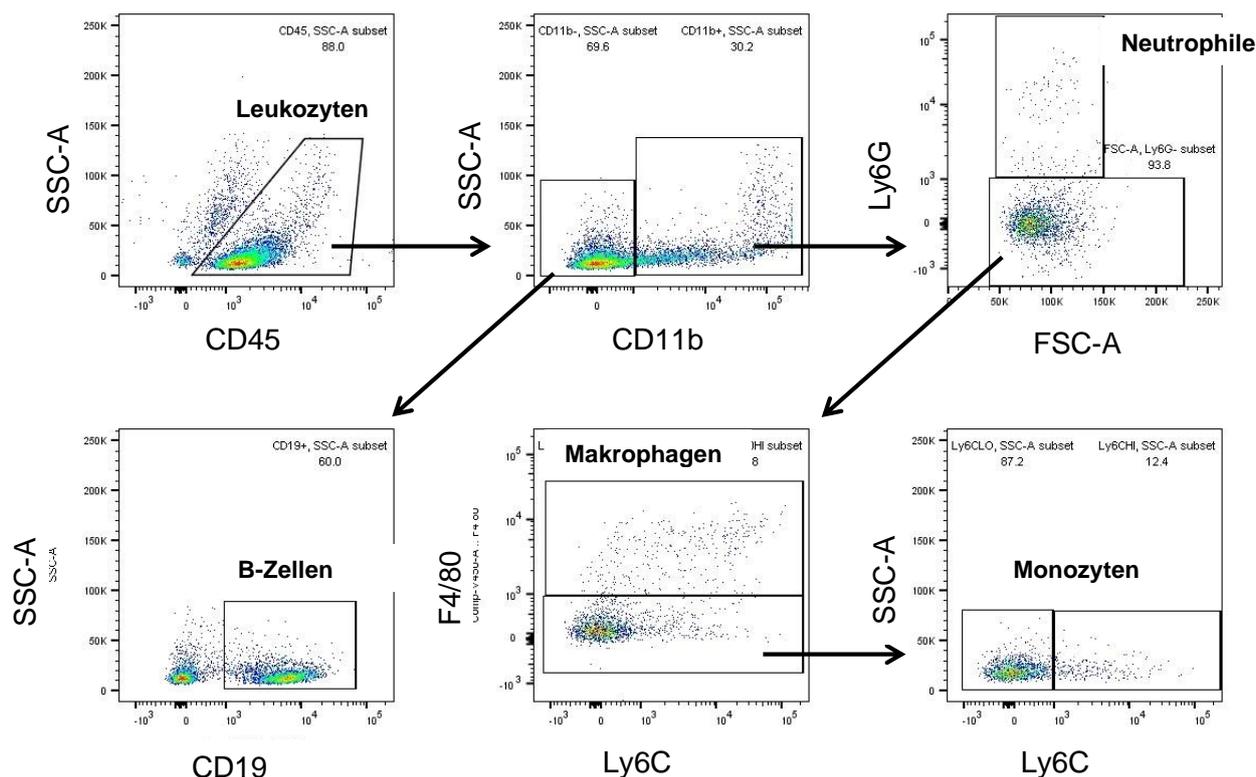


**Abb. 5: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen in Knochenmark und Milz**

Identifizierung von Leukozyten als CD45+; Auftrennung in CD11b- Lymphozyten und CD11b+ myeloide Zellen; Unterteilung der CD11b+ Zellen in Ly6G+ Neutrophile, Ly6G- CD115+ F4/80- Monozyten und Ly6G- F4/80+ Makrophagen; Einteilung der Monozyten in klassische und nichtklassische Monozyten anhand der Ly6C Expression.

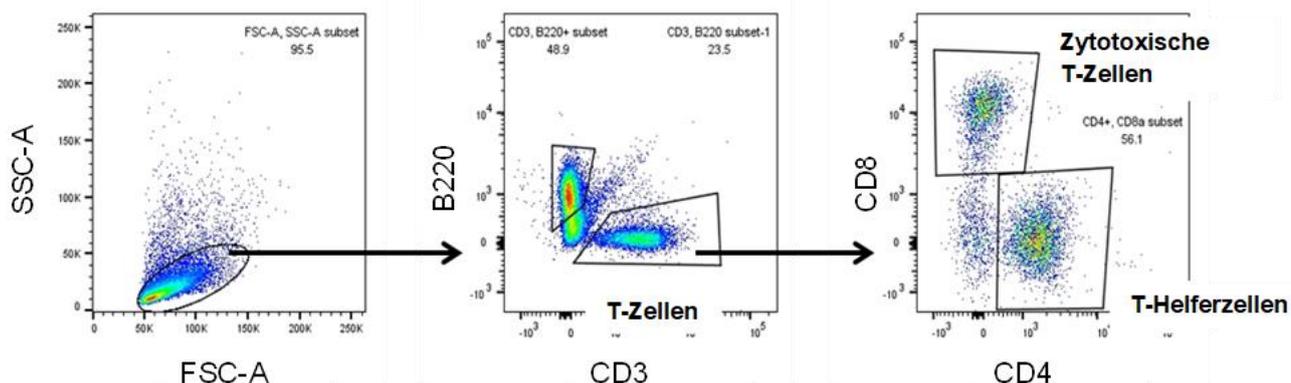


**Abb. 6: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im Herz**  
 Identifizierung von Leukozyten als CD45+; Auftrennung in CD11b- Lymphozyten und CD11b+ myeloide Zellen; Unterteilung der CD11b+ Zellen in Ly6G+ Neutrophile, Ly6G- F4/80+ Makrophagen, Ly6G- F4/80- CD11c+ dendritische Zellen und Ly6G- F4/80- CD11c- Monozyten; Einteilung der Makrophagen in CD206+ und CD206-; Einteilung der Monozyten in klassische, intermediäre und nichtklassische Monozyten anhand der Ly6C Expression.



**Abb. 7: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Leukozytenpopulationen im perikardialen Fettgewebe**

Identifizierung von Leukozyten als CD45+; Auftrennung in CD11b- Lymphozyten und CD11b+ myeloide Zellen; Bestimmung der B-Zellen als CD11b- CD19+; Unterteilung der CD11b+ Zellen in Ly6G+ Neutrophile, Ly6G- F4/80+ Makrophagen und Ly6G- F4/80- Monozyten; Einteilung der Monozyten in klassische und nichtklassische Monozyten anhand der Ly6C Expression.



**Abb. 8: Gating Strategie der Durchflusszytometrie für Lymphozyten im perikardialen Fettgewebe**

Identifizierung von Lymphozyten als kleine, wenig granulierte Zellen im SSC-A FSC-A Gating, Bestimmung von B220- CD3 + T-Zellen, Unterteilung der T-Zellen in CD8+ zytotoxische T-Zellen und CD4+ T-Helferzellen.

## 4.5.2 Protein Analyse

Um genotypabhängige Regulationen der durch AngII-induzierten myokardialen prohypertrophen Signalwege nachzuweisen, wurden Proteine aus dem Herzgewebe der verschiedenen Behandlungsgruppen isoliert und mittels Western Blot die Expression prohypertropher Kinasen und Rezeptoren bestimmt.

### 4.5.2.1 Proteinisolation

Nach Entnahme wurden die Herzen schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Proteinisolation wurden die Herzen zunächst gemörsert und so in feines Pulver überführt. Dabei wurde wiederholt flüssiger Stickstoff zugegeben, um das Auftauen des Gewebes und somit den Verlust von post-translationalen Modifikationen und die Degradation der Proteine zu verhindern. Ein Teil des pulverisierten Gewebes wurde anschließend für Ribonukleinsäure (RNA) Analysen separiert. Der für Proteinanalysen bestimmte Anteil wurde lysiert, um die Zellen aufzuschließen und die Proteine zu extrahieren. Dafür wurde das Volumen des pulverisierten Gewebes abgeschätzt und etwa die gleiche Menge an Standard Lysispuffer dazugegeben. Dem Puffer wurden zuvor Proteaseinhibitoren zugesetzt, um den Abbau von Proteinen zu verhindern. Die Proben wurden für 30 min auf Eis belassen und alle 5 min gevortext, um eine adäquate Lyse zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 16000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um die zytosolischen Proteine von Zelldebris zu trennen. Der Überstand mit den in Puffer gelösten Proteinen wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Prozessierung aufbewahrt.

### 4.5.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde per Bradford Assay bestimmt. Die Proteinlysate wurden im Verhältnis 1:50 mit Standard Lysispuffer verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde zudem eine Verdünnungsreihe bestehend aus 8 BSA-Lösungen ansteigender Proteinkonzentrationen (von  $0\ \mu\text{g/ml}$  bis  $20\ \mu\text{g/ml}$ ) angesetzt. Zu  $100\ \mu\text{l}$  BSA-Lösung wurden dabei je  $100\ \mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung des Standard Lysispuffers gegeben. Je  $10\ \mu\text{l}$  der BSA-Lösungen und der verdünnten Proteinlysate wurden dann in Triplikaten in eine 96-Well Mikrotiterplatte (BRAND, Wertheim) pipettiert. Dazu wurden je  $190\ \mu\text{l}$  Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (BIO-RAD, Hercules, USA) in eine Kavität (Well) gegeben. Durch die Bindung des Farbstoffes an das Protein kommt es zu einer Farbreaktion. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $595\ \text{nm}$  und einer Referenzwellenlänge von  $680\ \text{nm}$  mit dem Tecan Safire II photometrisch bestimmt. Anhand der Messwerte der BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration konnte eine Standardkurve erstellt und mithilfe dieser die Proteinkonzentration der Lysate berechnet werden.

### 4.5.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht ein Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden die Proteine auf ein Gel aufgetragen und wandern nach Anlegung einer Spannung von der Kathode zur Anode. Aufgrund der netzartigen Struktur des Gels werden die Proteine nach Größe aufgetrennt, da sich kleinere Proteine schneller bewegen, während größere Proteine nur langsam durch das Gel wandern. Dabei wird das stark negativ geladene Detergenz SDS zugegeben, das sich an Proteine anlagert und diesen eine negative Ladung verleiht. Dadurch ist es möglich, dass die Auftrennung der Proteine nur durch das Molekulargewicht und nicht durch die Ladung beeinflusst wird.

Je Probe wurden 50 µg Protein eingesetzt. Zur Vorbereitung wurden alle Proben unter Zugabe von Standard Lysispuffer auf das gleiche Volumen angeglichen. Anschließend wurde 5x Laemmli Ladepuffer hinzugefügt und die Proteine durch fünfminütiges Kochen bei 95°C zur Primärstruktur denaturiert.

Sammel- und Laufgel wurden gemäß Tab. 14 hergestellt. Anhand des Molekulargewichts der nachzuweisenden Proteine wurde ein 10%- oder 8%-iger Acrylamid Anteil im Laufgel gewählt, der die Porengröße des Gels bestimmt. Die Polymerisation des Gels wurde durch Zugabe von APS und TEMED ausgelöst. Je zwei Gele wurden in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Kammer gegeben und die Proben sowie ein Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA) aufgetragen, um später die Größe detektierter Proteine bestimmen zu können. Die Proteine wurden unter Anlegung eines elektrischen Feldes mit dem PowerPac™ aufgetrennt. Dabei wurde während der Durchquerung des Sammelgels zunächst eine niedrige Spannung von 50 V eingestellt. Nachdem die Proben das Laufgel erreicht hatten, wurde diese auf 120 V erhöht.

**Tab. 14: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für Western Blot Analysen**

Tris; Trishydrosymethylaminomethan; HCl; Salzsäure/Chlorwasserstoffsäure; APS Ammoniumpersulfat

Sammelgel	330 µl (30%) Acrylamid 250 µl Tris-HCl, pH 6,8 20 µl (10%) SDS 1,4 ml H <sub>2</sub> O 20 µl (10%) APS 5 µl TEMED	
Laufgel	<u>10%</u> 2,6 ml (30%) Acrylamid 2 ml Tris-HCl, pH 8,8 75 µl (10%) SDS 3 ml H <sub>2</sub> O 75 µl (10%) APS 10 µl TEMED	<u>8%</u> 2 ml (30%) Acrylamid 2 ml Tris-HCl, pH 8,8 75 µl (10%) SDS 3,6 ml H <sub>2</sub> O 75 µl (10%) APS 10 µl TEMED

#### 4.5.2.4 Proteintransfer

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Pierce Power Blotter von dem Gel auf eine Nitrocellulose Membran (GE healthcare life sciences, Amersham) übertragen. Dabei wurde ein Semi-Dry-Blot-System verwendet. Gel und Membran wurden übereinandergelegt und umgeben von Whatman Filterpapieren zwischen Anode und Kathode platziert. Alle Materialien wurden mit Transferpuffer befeuchtet. Der Transfer wurde für 16 min und 30 s mit einer Stromstärke von 1.8 A bei einer Spannung von 25 V durchgeführt. Proteine mit hohem Molekulargewicht wurden innerhalb von 16 min mit einer Stromstärke von 5 A und einer Spannung von 10 V auf die Membran transferiert.

Anschließend wurde die Membran mit Ponceau Rot Lösung gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Der Farbstoff Ponceau S bindet reversibel das gesamte Protein auf der Membran. Von der Ponceau Rot Färbung wurde eine Aufnahme angefertigt, um die Quantifizierung des geladenen Gesamtproteins als Referenz für die mittels Antikörper detektierten Proteinbanden zu ermöglichen. Danach wurde die Membran mit 5%iger Magermilch-TBS (Tris-buffered saline) -Tween Lösung für 30 min bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische AK Bindungen zu vermeiden.

#### 4.5.2.5 Proteindetektion

Im Anschluss an den Proteintransfer wurden die Proteine von Interesse auf der Membran mittels Immundetektion nachgewiesen. Die Membran wurde zunächst bei 4°C über Nacht mit einem der unter 3.3. gelisteten Primärantikörper inkubiert, die jeweils gegen Epitope eines spezifischen Proteins gerichtet sind. Nach fünfminütigem Waschen mit TBS-Tween Lösung erfolgte dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit des Anti-Kaninchen AKs betrug 30 min, die des Anti-Maus AKs 60 min. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, das die Detektion der Proteine ermöglicht. Die Meerrettichperoxidase fungiert als Reportermolekül und kann nach Zugabe von Luminol und Peroxid eine Lichtreaktion katalysieren. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit TBS-Tween Lösung wurde zur Detektion je 1 ml Luminol und Peroxid Lösung des Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) auf die Membran gegeben und das gesuchte Protein mit dem Fusion Solo S System detektiert. Für schwach exprimierte Proteine wurde das Amersham ECL (enhanced chemiluminescence) Western Blotting detection reagent verwendet, das zusätzlich Chemilumineszenz Verstärker enthält. Je nach Stärke der Proteinexpression wurde die Expositionszeit zur Detektion der Proteinbanden angepasst.

#### 4.5.2.6 Quantifizierung der Proteinexpression

Die Intensität der detektierten Proteinbanden wurde anschließend mit der Image Studio Lite Software quantifiziert. Durch das Programm lässt sich die optische Dichte der Banden des untersuchten, mittels Antikörper detektierten Proteins messen. Zur Normalisierung wurde die optische Dichte der Proteinbande einer Probe jeweils durch die optische Dichte des Gesamtproteins dieser Probe dividiert, welches mit Ponceau Rot detektiert wurde. Zur Auswertung wurde dann die relative Proteinexpression der einzelnen Proben bezogen auf die Vehikel behandelte WT Gruppe berechnet, die im gesamten Projekt als Kontrollgruppe diente.

#### 4.5.3 RNA Analyse

Zur näheren Charakterisierung der hypertrophen Genexpression in *Gpr55* KO und WT Tieren wurde nach 28-tägiger AngII oder Vehikel Infusion die kardiale mRNA (messenger ribonucleic acid) Expression bestimmter, mit der Hypertrophie assoziierter Gene untersucht. Dafür wurde zunächst RNA isoliert, in cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) umgewandelt und dann die Expression spezifischer Gene mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) bestimmt.

##### 4.5.3.1 RNA Isolation

Nach Entnahme wurde das Herzgewebe schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um die Zellen für die RNA Isolation zugänglich zu machen, wurden die Herzen gemörsert und so in feines Pulver überführt. Dabei wurde wiederholt flüssiger Stickstoff zugegeben, um eine Schädigung der RNA zu verhindern. Zur weiteren Verarbeitung des für RNA Analysen abgetrennten Anteils des gemörserten Gewebes wurde zur RNA Isolation das Total RNA KIT S-Line (Peqlab) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml Trizol und einer Metall Kugel im TissueLyser bei 50 Umdrehungen pro Sekunde für zwei Minuten lysiert. Nach Zumischung von Chloroform, fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation (12000g, 5 min) konnte die RNA Phase von Proteinen und DNA (deoxyribonucleic acid) getrennt werden. Verbleibende DNA Reste wurden dann durch ein DNA bindendes Säulchen entfernt. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte wurde die RNA unter Verwendung RNA bindender Säulchen mit den Waschpuffern I und II aufgereinigt und zuletzt in 20-30  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser eluiert.

##### 4.5.3.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Um zu gewährleisten, dass je Probe dieselbe RNA Menge in cDNA umgeschrieben wird, wurde die RNA Konzentration gemessen. Die Absorption von Nukleinsäuren erreicht in ultraviolettem Licht einer Wellenlänge von 260 nm ihr Maximum. Daher wurde die RNA Konzentration photometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit

dem NanoPhotometer® bestimmt. Zur Qualitätskontrolle wurden die A260:A280 und A260:A230 Quotienten bestimmt, um Verunreinigungen der Proben mit Protein (Absorptionsmaximum bei 280 nm) oder Phenol (Absorptionsmaximum bei 230 nm) auszuschließen. Dabei liegt das A260:A280 Verhältnis reiner RNA mit ~2 über dem von reiner DNA mit ~1,8.

#### 4.5.3.3 cDNA Synthese

Es wurde je 1 µg der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurden alle Proben mit RNase freiem Wasser auf dasselbe Volumen, je nach Konzentration auf 5 µl oder 10 µl, adjustiert. Das Umschreiben erfolgte unter Verwendung des PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara). Nach Zugabe des Reverse Transkription (RT)-Ansatzes (5 µl auf 5 µl Probe bzw. 10 µl auf 10 µl Probe) (Tab. 15) wurden die Proben nach folgendem Schema inkubiert: 15 min 37°C; 15 s 85°C. Als Negativkontrolle wurde zudem eine RT-Kontrolle erstellt, in die statt RNA dieselbe Menge RNase freies Wasser pipettiert wurde. Diese wurde in der reversen Transkription eingesetzt, um eine mögliche Verunreinigung von Wasser oder RT-Mix auszuschließen.

**Tab. 15: Reverse Transkription Ansatz für die cDNA Synthese**

Für 5 µl Mix	
5x Prime Script Puffer	2 µl
PrimeScript RT Enzym mix I	0,5 µl
Oligo (dt)-Primer (50µM)	0,5 µl
Random Hexamer Primer(100 µM)	2 µl

#### 4.5.3.4 Quantitative Real-Time PCR

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es, gezielt einzelne DNA bzw. cDNA Abschnitte zu vervielfältigen. Dafür werden die cDNA Doppelstränge durch Hitze getrennt (Denaturierung), Primer an die entstehenden cDNA Einzelstränge angelagert (Annealing) und die Zielsequenz zwischen den Vorwärts- und Rückwärts-Primern, vergleichbar mit der physiologischen Replikation, mittels einer komplementären Bindung von Nukleotiden an die cDNA durch eine DNA-Polymerase amplifiziert (Elongation). Durch Wiederholungen dieses Vorganges kommt es dabei zum exponentiellen Anstieg des jeweiligen cDNA Abschnittes bis die, der Reaktion zugegebenen, Substrate aufgebraucht sind, die Aktivität der DNA-Polymerase abnimmt und eine Plateauphase erreicht wird. Bei der quantitativen Real-Time PCR kann die vorhandene cDNA-Menge zusätzlich quantifiziert werden, indem die Zunahme der Amplifikate in Echtzeit gemessen wird. Dafür wurde die Taqman Technologie verwendet. Dabei werden neben den Primern fluorogene Sonden zugegeben, die an die einzelsträngige Zielsequenz binden. Die Sonden sind mit einem Quencher und einem Reporter Molekül markiert. Durch die räumliche Nähe verhindert der Quencher die Abgabe des Fluoreszenzsignals durch den Reporter. Wenn die

Polymerase die mit der Sonde hybridisierte Frequenz abliest, hydrolysiert sie die Sonde, um den komplementären cDNA-Strang bilden zu können. Dadurch wird der Quencher vom Reporter getrennt und kann dessen Fluoreszenz nicht mehr supprimieren. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität durch den Reporter ist dabei direkt proportional zur Anzahl der gebildeten Amplifikate. Dadurch kann während der exponentiellen Phase der Reaktion die Menge der gesuchten cDNA in der jeweiligen Probe quantifiziert werden. Dafür wird für jede Probe der Ct (cycle treshold) Wert bestimmt, der der Anzahl von Zyklen entspricht, nach der die von der Probe stammende Fluoreszenz erstmals größer als die Hintergrundfluoreszenz wird und damit detektiert werden kann.

Zur Vorbereitung der qPCR wurde die cDNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Im Folgenden wurden zu je 4,6 µl cDNA 15,4 µl des in Tab. 16 aufgeführten qPCR Ansatzes in eine 96-Well Platte (VWR, Radnor, USA) gegeben. Die Proben wurden in Duplikaten pipettiert. Es wurden die unter 3.4. aufgelisteten Primer/Sonden von LifeTechnology oder MWG eingesetzt.

**Tab. 16: Ansatz für qPCR Analysen**

GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega)	10,4 µl	
<b>MWG Primer</b>	<b>LifeTechnology Primer</b>	
Forward-Primer	0,008 µl	Primer-Probe-Mix 0,5 µl
Reverse-Primer	0,008 µl	H <sub>2</sub> O 4,5 µl
Sonde	0,002 µl	
H <sub>2</sub> O	482 µl	

Forward-Primer/Vorwärts-Primer; Reverse-Primer/Rückwärts-Primer; Primer-Probe-Mix/Primer-Sonden-Mischung

Anschließend erfolgte die Amplifikation der cDNA im qPCR Cyclor unter Verwendung der SDS 2.4 Software über 40 Zyklen. Dabei wurde das in Tab. 17 aufgeführte Fast qPCR Programm mit der Referenzfarbe ROX angewandt.

**Tab. 17: Program für die qPCR Analyse (Fast qPCR Program)**

	40 Wiederholungen	
Enzymaktivierung	Denaturierung	Annealing/Elongation
20 s 95°C	1 s 95°C	20 s 60°C

#### 4.5.3.5 Quantifizierung der mRNA Expression

Zur Bestimmung der mRNA Expression der Gene von Interesse wurde der Mittelwert der Ct Werte der Duplikate verwendet. Die relative mRNA Expression wurde nach der  $\Delta\Delta Ct$  Methode

bestimmt. Zur Normalisierung wurde nach jeder cDNA Synthese in allen Proben das Housekeeping Gen *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mittels qPCR detektiert und der *Gapdh* Ct Wert jeder Probe von dem Ct Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta Ct = Ct \text{ Wert (Zielgen)} - Ct \text{ Wert (Gapdh)}$$

Die relative mRNA Expression bezogen auf die im Projekt als Kontrollgruppe dienende Vehikel behandelte WT Gruppe wurde dann wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Zielgen}) - (\text{Mittelwert der } \Delta Ct \text{ Werte der Kontrollgruppe})$$

$$\text{Relative RNA Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 4.6 Histologie

### 4.6.1 Anfertigung von Herzschnitten

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Kardiomyozytenhypertrophie und der myokardialen Fibrose nach 28-tägiger AngII oder Vehikel Infusion der *Gpr55* KO und WT Mäuse wurden die Kardiomyozytengröße sowie die LV Fibrose histologisch bestimmt. Dafür wurde eine transverse, mittventrikuläre etwa 1 mm dicke Scheibe des Herzens in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C für mindestens 24 h fixiert. Danach wurde das Gewebe in Einbettkassetten (MEDITE) platziert und über Nacht in einer vollautomatischen Histokinette entwässert (Tab. 18). Dabei wird dem Gewebe zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe das Wasser entzogen. Da Alkohol und Paraffin nicht miteinander vermischt werden können, wird das Gewebe danach mit Xylol gereinigt, bevor es in Paraffin gegeben wird.

**Tab. 18: Protokoll der Histokinette zur Entwässerung**

70% Ethanol	1 h
70% Ethanol	1 h
96% Ethanol	1 h
96% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
Xylol	1 h
Xylol	1 h
Xylol	1 h
Paraffin	1 h
Paraffin	1 h
Paraffin	1 h

Danach wurden die Herzen in Einbettförmchen überführt und in heißem Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden dann auf einer Eisplatte ausgehärtet. Anschließend wurden am Mikrotom (Cut 6062, SLEE, Nieder-Olm) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, in einem warmen Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) übertragen. Vor einer anschließenden Färbung wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen.

#### 4.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Messung des Durchmessers und Umfangs der Kardiomyozyten wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der mittventrikulären Herzschnitte angefertigt. Bei dieser kommen zwei Farbstoffe zum Einsatz: Das Hämatoxylin färbt saure bzw. basophile Strukturen und daher Zellkerne, die reich an Desoxyribonukleinsäuren sind, sowie das raue Endoplasmatische Retikulum blau an. Eosin, als saurer Farbstoff, färbt dagegen acidophile bzw. basische Strukturen, wie das Zytoplasma oder Mitochondrien, rot. Die Färbung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt (Tab. 19). Dabei erfolgte zunächst die vollständige Deparaffinierung der Präparate durch Xylol, die Rehydrierung durch eine Alkoholreihe und die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Nach der erneuten Entwässerung durch Isopropanol wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt.

**Tab. 19: Protokoll der HE-Färbung**

<b>HE Färbung</b>	
Xylol	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 min
90% Isopropanol	2 min
70% Isopropanol	2 min
H <sub>2</sub> O destilliert (dest.)	5 min
Hämatoxylin nach Mayer	20 min
H <sub>2</sub> O dest.	spülen
HCL-Alkohol	1 s optional
H <sub>2</sub> O dest.	spülen
Fließend bläuen	15 min
H <sub>2</sub> O dest.	spülen
Eosin	15 s
H <sub>2</sub> O dest.	spülen
90% Isopropanol	2 min
100% Isopropanol	2 min

## Methoden

Xylol	3 x 3 min
-------	-----------

Eosin wurde vor der Färbung mit 0,02% Eisessig (v/v) versetzt.

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

Von den fertigen Präparaten wurden anschließend Aufnahmen aus allen linksventrikulären Wandabschnitten in 40-facher Vergrößerung am Stereomikroskop angefertigt. Auf diesen wurden pro Herz 50-100 querschnittene, annähernd runde Kardiomyozyten mit zentral gelegtem Nukleus vermessen. Mithilfe der LAS V4.3 Software wurde die Querschnittsfläche nach manuellem Umfahren der Zellgrenzen bestimmt. Der Durchmesser wurde als Länge der kürzesten direkten Strecke durch den Zellkern zwischen den Zellmembranen gemessen.

#### 4.6.3 Sirius Red Färbung

Zur Quantifizierung der myokardialen Fibrose wurde eine Sirius Red Färbung der mittventrikulären Herzschnitte durchgeführt. Der anionische, langkettige Farbstoff Sirius Red lagert sich dabei an die Kollagenfasern an. Infolgedessen färben sich Kollagenfasern rot, während sich die Kardiomyozyten gelb darstellen. Die Färbung wurde nach dem unten aufgeführten Protokoll durchgeführt (Tab.20). Anschließend erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Entellan.

**Tab. 20: Protokoll der Sirius Red Färbung**

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

Zur Auswertung wurden Aufnahmen des gesamten linken Ventrikels in 10-facher Vergrößerung am Stereomikroskop angefertigt. Mithilfe der Software Fiji (ImageJ) wurde der Anteil der roten Kollagen-Anteile am Gesamtventrikel bestimmt. Daraus ergibt sich der prozentuale Kollagenanteil des linken Ventrikels.

## 4.7 Statistik

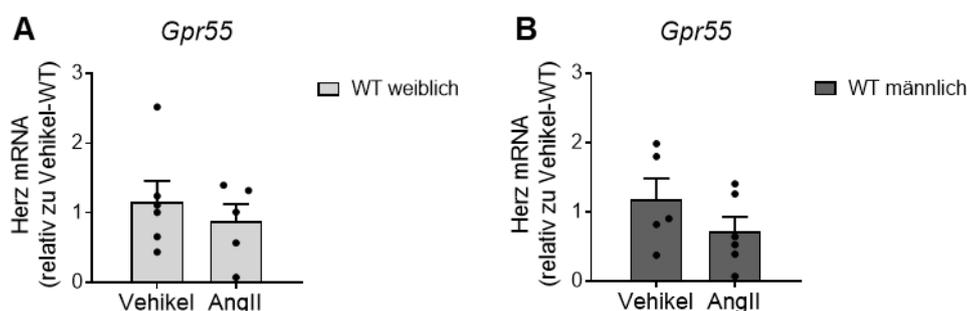
Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standard error of the mean) abgebildet. Zur statistischen Analyse der vier Behandlungsgruppen wurde mit der GraphPad Prism (Version 7) Software eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit anschließendem Šidák Post-hoc-Test durchgeführt. Wurden nur zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte ein ungepaarter t-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt und die exakten p-Werte wurden in den Graphen angegeben.

## 5. Ergebnisse

Die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Lipidrezeptors GPR55 in der AngII-induzierten Hypertrophie wurde anhand der Phänotypisierung von *Gpr55* KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle näher charakterisiert. Dazu kamen gravimetrische, echokardiographische, histologische und molekularbiologische Methoden zum Einsatz, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

### 5.1 Einfluss von AngII auf die kardiale *Gpr55* Rezeptorexpression

Um zunächst zu untersuchen, ob *Gpr55* im Herzen exprimiert wird und, ob AngII Einfluss auf die kardiale *Gpr55* Rezeptorexpression nimmt, wurde diese auf mRNA Ebene in WT Herzen bestimmt (Abb. 9). Dabei konnte eine kardiale *Gpr55* Rezeptorexpression nachgewiesen werden, die keiner AngII bedingten Regulation unterlag. Dies traf auf beide untersuchten Geschlechter zu (Abb. 9 A-B). Leider steht bis heute kein spezifischer Antikörper zur Verfügung, um den Rezeptor auch auf Proteinebene nachzuweisen.



#### Abb. 9: Kardiale *Gpr55* Rezeptorexpression in Folge chronischer AngII Infusion

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von *Gpr55* in (A) weiblichen und (B) männlichen WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

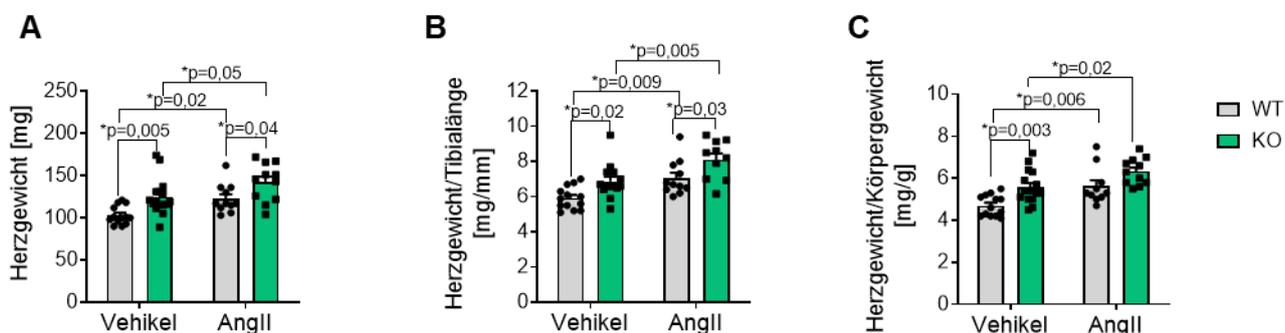
Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=5-6); ungepaarter t-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

### 5.2 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf das AngII-induzierte strukturelle LV Remodeling

Das AngII-induzierte kardiale kompensatorische Remodeling ist gekennzeichnet durch eine konzentrische Hypertrophie. Dabei kommt es zu einer Größenzunahme der Kardiomyozyten, zu einem Anstieg des Herzgewichts und zur Zunahme der linksventrikulären Wanddicke, die von einer Verkleinerung der Kavitäten begleitet wird. Um die Rolle von GPR55 hierin zu untersuchen, wurden zunächst die Veränderungen der kardialen Morphologie infolge der 28-tägigen Angiotensin II Gabe durch gravimetrische, echokardiographische und histologische Untersuchungen in weiblichen *Gpr55* KO und WT Mäusen beurteilt.

Zunächst erfolgte eine gravimetrische Analyse des Herzgewichts (Abb. 10). In der weiblichen Kohorte zeigten beide Genotypen wie erwartet eine Zunahme des Herzgewichts nach 28-tägiger AngII Infusion. Die KO Herzen waren jedoch bereits unter Vehikelbedingungen, aber auch nach AngII Gabe signifikant schwerer im Vergleich zur jeweiligen WT Kontrollgruppe (Abb. 10 A). Durch eine Normalisierung des Herzgewichts auf die Tibiallänge und das Körpergewicht konnte ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und Behandlungsgruppen auf einer Veränderung von Körpergröße oder -gewicht beruhen (Abb. 10 B-C). Somit führte die Abwesenheit von *Gpr55* bereits *per se* zu einem erhöhten Herzgewicht in Weibchen ohne Einfluss auf das Ausmaß der AngII-induzierten Hypertrophie.



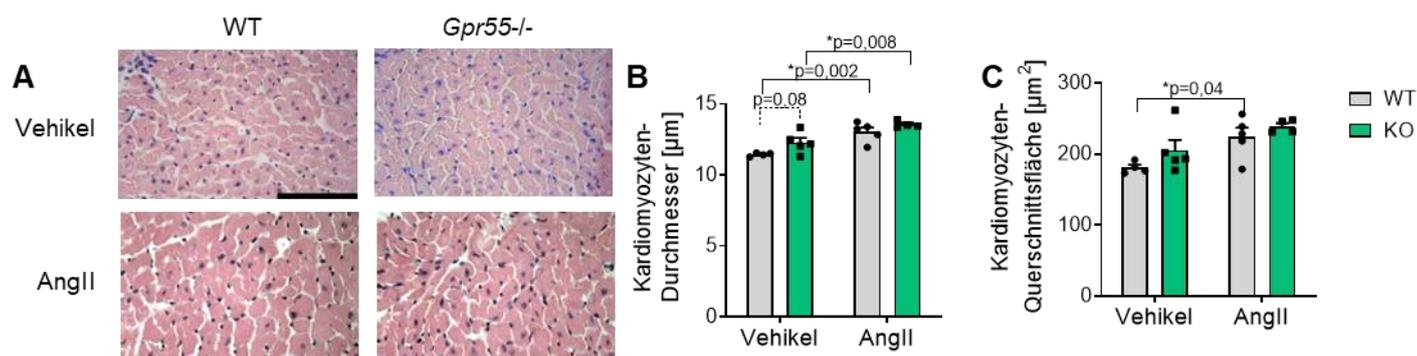
**Abb. 10: Gravimetrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die AngII-induzierte Hypertrophie in Weibchen**

(A) Herzgewicht, Verhältnis von Herzgewicht zu (B) Tibiallänge und (C) Körpergewicht in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10-16); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Eine Erhöhung des Herzgewichts kann durch eine Größenzunahme der Kardiomyozyten verursacht werden. Im Zuge der pathologischen konzentrischen Hypertrophie kommt es zu einer Vergrößerung von Kardiomyozytendurchmesser und -Querschnittsfläche. Beide Parameter wurden in HE gefärbten, mittventrikulären Schnitten der weiblichen WT und KO Herzen bestimmt (Abb. 11). Die AngII Infusion führte in beiden Genotypen zu einer Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers sowie zu einer Vergrößerung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche, die jedoch nur in WT Herzen Signifikanz erreichte (Abb. 11 B-C).



### Abb. 11: Histologische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die AngII-induzierte LV Hypertrophie

(A) Repräsentative Aufnahmen der HE gefärbten, mittventrikulären Herzschnitte in 40-facher Vergrößerung, Maßstab 100 µm, (B) Kardiomyozytendurchmesser und (C) Kardiomyozytenquerschnittsfläche in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM (n=4-5); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

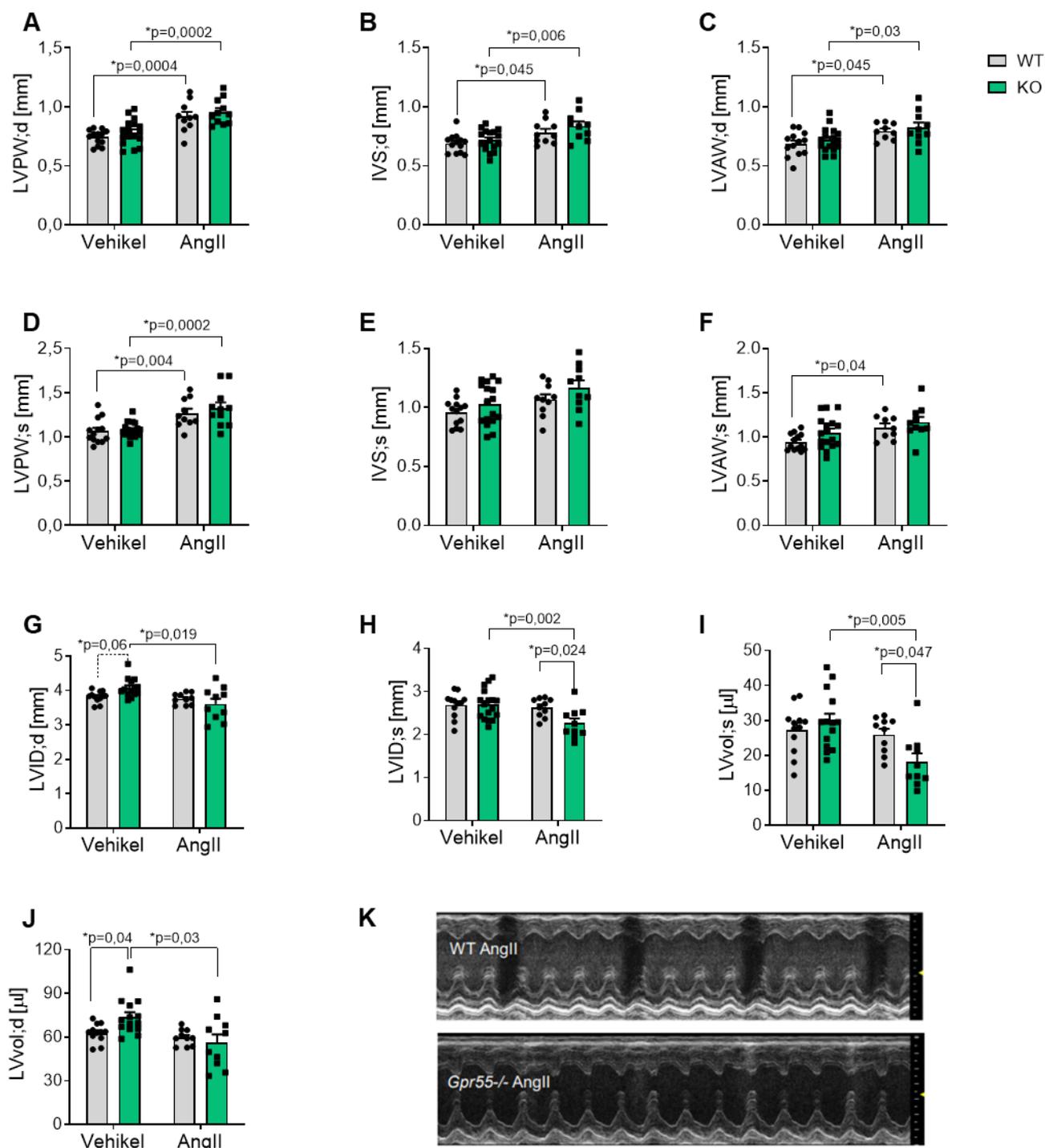
Folglich spiegelte sich die AngII bedingte Gewichtszunahme von WT und KO Herzen in einer Vergrößerung der Kardiomyozyten wider. Zudem lässt sich bereits unter Vehikelbedingungen ein Trend hin zu einem im Vergleich zur WT Kontrollgruppe größeren Durchmesser der KO Kardiomyozyten vermuten (p=0,08) (Abb. 11 B). Korrespondierend mit dem basal erhöhten Herzgewicht in weiblichen *Gpr55* KO Mäusen deutet dies einen basalen Einfluss von GPR55 auf die kardiale Struktur an.

Um den Einfluss von GPR55 auf die AngII-induzierte konzentrische Hypertrophie näher zu untersuchen, wurden echokardiographisch die linksventrikulären Wanddicken und Kavitäten in weiblichen Versuchstieren analysiert (Abb. 12). Unter Vehikelbedingungen konnte kein Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Dicke der Vorder- und Hinterwand oder des interventrikulären Septums beobachtet werden (Abb. 12 A-F). Die druckinduzierte Wanddickenzunahme der Hinterwand war am stärksten ausgeprägt und entwickelte sich in beiden Genotypen in vergleichbarem Ausmaß. Auch die AngII-induzierte Hypertrophie des LV Septums und der Vorderwand blieb unbeeinflusst vom Genotyp. Beide Wandabschnitte zeigten diastolisch eine AngII bedingte signifikante Verdickung (Abb. 12 A-C). Die gleichen Tendenzen konnten in der Systole beobachtet werden (Abb. 12 D-F). Die Wandverdickung wurde jedoch nur in den KO Herzen durch eine gleichzeitige konzentrische Verkleinerung des diastolischen LV Durchmessers und Volumens gegenüber der entsprechenden Vehikelgruppe widergespiegelt, obwohl KO Herzen bereits unter ungestressten Vehikelbedingungen signifikant vergrößerte diastolische Volumina und tendenziell vergrößerte diastolische Durchmesser (p=0,06) als die WT Tiere aufwiesen (Abb. 12 G, J). Dies weist auf eine GPR55 abhängige Veränderung der linksventrikulären Füllung und des Auswurfs hin. Das basal erhöhte diastolische Volumen könnte zudem Ursache für das erhöhte Herzgewicht in Abwesenheit von *Gpr55* Signalisation sein sowie auf eine er-

---

höhte Vorlast hinweisen oder auch auf veränderte plastische Herzmuskeigenschaften zurückzuführen sein. Das nach AngII Behandlung im Vergleich zu WT Herzen verkleinerte systolische Volumen der KO Herzen (Abb. 12 H, I), bei gegenüber der WT Kontrollgruppe nicht verkleinertem diastolischem Volumen, deutet darüber hinaus auf eine verbesserte linksventrikuläre Kontraktilität in Abwesenheit von *Gpr55* hin.

## Ergebnisse



**Abb. 12: Echokardiographische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die AngII-induzierte LV Hypertrophie in Weibchen**

(A-C) Enddiastolische und (D-F) endsystolische Dicke der LV Hinterwand (LVPW;d), des interventrikulären Septums (IVS;d) und der LV Vorderwand (LVAW;d) in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle. (G,J) Enddiastolische und (H,I) endsystolische Durchmesser (LVID;d/s) und Volumina (LVvol;d/s) in allen Behandlungsgruppen. (K) Repräsentative echokardiographische mittventrikuläre M-Mode Projektionen von AngII behandelten KO Mäusen sowie der korrespondierenden WT Kontrollgruppe.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=9-17); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105))

## Ergebnisse

In der männlichen Kohorte zeigte sich eine gegenüber der weiblichen Kohorte geringer ausgeprägte, nicht signifikante Zunahme des Herzgewicht normalisiert auf das Körpergewicht nach AngII Infusion in WT Mäusen ( $p=0,05$ ) (Tab. 21). Zudem konnte keine genotypabhängige Regulation des Herzgewichts nachgewiesen werden. Auch echokardiographisch konnte in Männchen unabhängig vom Genotyp nur eine milde Hypertrophie, beobachtet werden (Tab. 22). So induzierte AngII eine Hypertrophie der LV Hinterwand, die in der KO Gruppe gegenüber der WT Kontrollgruppe stärker ausgeprägt war. Im Gegensatz zur weiblichen Kohorte waren Durchmesser und Volumen in der Diastole in männlichen KO Herzen unter Vehikelbedingungen nicht vergrößert gegenüber der WT Kontrollgruppe. Dagegen zeigte sich auch in der männlichen Kohorte nach AngII Infusion in der Systole eine signifikante Reduktion von Durchmesser und Volumen in KO Herzen im Vergleich zu den WT Kontrollen.

**Tab. 21: Gravimetrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die strukturelle AngII-induzierte LV Hypertrophie in Männchen**

	WT Vehikel (n=6-8)	KO Vehikel (n=12-15)	WT AngII (n=8)	KO AngII (n=10-14)
Herzgewicht [mg]	134,9 ± 5,2	134,5 ± 6,8	152,9 ± 10,1	153,7 ± 7,3
Herzgewicht/Tibiallänge [mg/mm]	7,6 ± 0,4	7,6 ± 0,4	8,7 ± 0,5	8,5 ± 0,4
Herzgewicht/Körperge- wicht [mg/g]	4,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,3

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \* $p<0,05$  AngII vs. Vehikel; # $p<0,05$  KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

**Tab. 22: Echokardiographische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die strukturelle AngII-induzierte LV Hypertrophie in Männchen**

	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=15-16)	WT AngII (n=5-6)	KO AngII (n=14)
LVPW;d [µm] ± SEM	0,79 ± 0,03	0,85 ± 0,05	0,93 ± 0,05	1,11 ± 0,05 *
LVPW;s [mm]	1,16 ± 0,07	1,23 ± 0,07	1,21 ± 0,08	1,54 ± 0,05 *#
IVS;d [mm]	0,74 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,83 ± 0,05	0,86 ± 0,05
IVS;s [mm]	0,97 ± 0,03	1,07 ± 0,05	1,11 ± 0,05	1,18 ± 0,06
LVAW;d [mm]	0,69 ± 0,04	0,79 ± 0,03	0,82 ± 0,04	0,84 ± 0,04
LVAW;s [mm]	0,96 ± 0,03	1,12 ± 0,04	1,13 ± 0,06	1,19 ± 0,06

## Ergebnisse

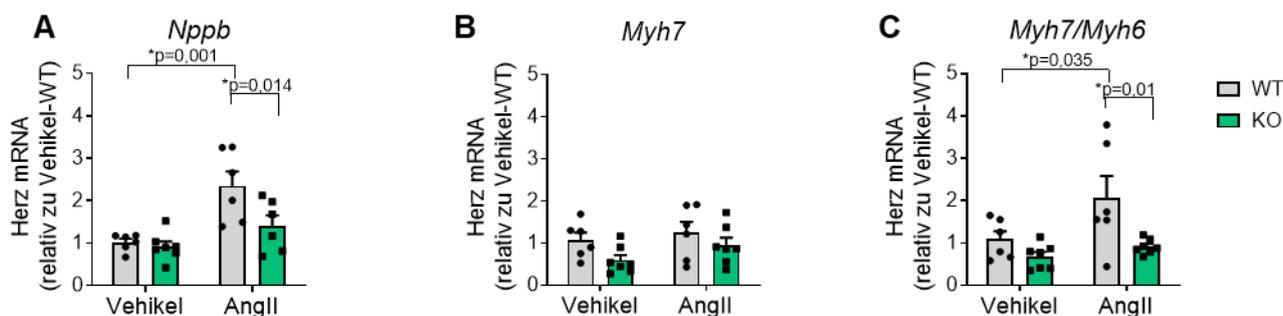
LVID;d [mm]	4,28 ± 0,07	4,03 ± 0,13	4,04 ± 0,18	3,69 ± 0,09
LVID;s [mm]	3,15 ± 0,10	2,79 ± 0,12	3,03 ± 0,17	2,30 ± 0,09 *#
LVvol;d [μl]	82,5 ± 3,2	72,6 ± 5,6	72,9 ± 8,2	58,3 ± 3,3
LVvol;s [μl]	39,7 ± 3,1	30,6 ± 3,5	36,7 ± 5,3	18,8 ± 1,8 *#

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05 AngII vs. Vehikel; #p<0,05 KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Zusammenfassend zeigte sich die Ausprägung des AngII-induzierten strukturellen Remodelings in einer Veränderung des Herzgewichts, der Zellmorphologie und der Wanddicke unabhängig vom Genotyp, war jedoch in Männchen gegenüber Weibchen geringer ausgebildet. Dagegen konnte unabhängig vom Geschlecht in Abwesenheit von *Gpr55* eine Potenzierung der AngII-induzierten Abnahme des systolischen Volumens und somit ein Hinweis auf eine verstärkte Kontraktilität AngII behandelter KO Herzen beobachtet werden. Abhängig vom Geschlecht beeinflusste die *Gpr55* Deletion insbesondere die basale Ventrikelgeometrie im Sinne einer diastolischen Dilatation sowie einer Erhöhung des basalen Herzgewichts in weiblichen KO Mäusen.

### 5.3 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf hypertrophe Signalkaskaden

Der morphologischen Ausprägung der konzentrischen Hypertrophie liegen auf molekularer Ebene die Aktivierung prohypertropher Signalkaskaden sowie eine veränderte mRNA und Proteinexpression zugrunde. Um den Einfluss von GPR55 auf AngII-induzierte prohypertrophe Signalwege aufzudecken, wurde in *Gpr55* KO und WT Herzen zunächst die hypertrophe Genexpression analysiert. Im Zuge des kardialen Remodelings kommt es zur Reexpression des fetalen Gens *Nppb* im linken Ventrikel sowie der Reexpression der fetalen  $\beta$ -Isoform der Myosin Schwerketten anstelle der adulten  $\alpha$ -Isoform. Eine in der weiblichen Kohorte durchgeführte Analyse der fetalen Genexpression auf mRNA Ebene im Herz ist in Abb. 13 dargestellt. Die Abwesenheit von *Gpr55* führte zur Suppression der AngII-induzierten Hochregulation von *Nppb* (Abb. 13 A). Darüber hinaus stieg das *Myh7/Myh6* Expressionsverhältnis AngII bedingt in WT Herzen signifikant an, jedoch nicht in *Gpr55* deletierten Herzen (Abb. 13 C). Diese Beobachtung komplementierte das Bild einer Inhibition der Reexpression fetaler Gene in Abwesenheit von *Gpr55*.

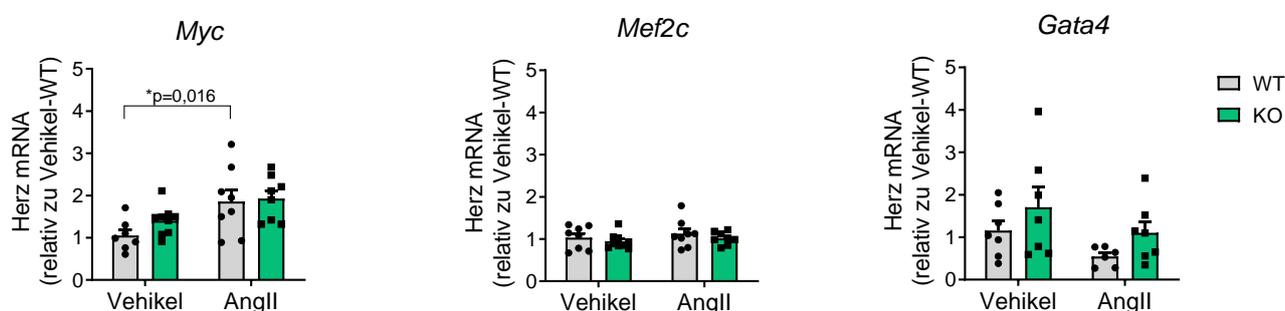


### Abb. 13: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Reexpression fetaler Gene in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (A) *Nppb*, (B) *Myh7* und dem (C) Verhältnis der *Myh7* Expression zur *Myh6* Expression in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=6-7); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Um zu prüfen, worauf das unveränderte Ausmaß der strukturellen Hypertrophie in Abwesenheit von *Gpr55* trotz Suppression des fetalen Genprogramms zurückgeführt werden kann, wurde die Expression weiterer wichtiger Regulatoren der LV Hypertrophie in Vehikel und AngII behandelten Herzen gemessen. Als Teil der „immediate early“ Gene und damit als früher Marker der Hypertrophie wurde die Expression von *Myc* bestimmt. Nach 28-tägiger kontinuierlicher AngII Infusion konnte ein Anstieg von *Myc* nur in weiblichen WT Mäusen beobachtet werden (Abb. 14 A). Darüber hinaus wurde die Expression von *Mef2c* als Vermittler der pathologischen Hypertrophie sowie von *Gata4*, einem Transkriptionsfaktor, der als wichtiger Regulator der physiologischen Hypertrophie gilt, quantifiziert. Bezüglich der mRNA Expression von *Mef2c* und *Gata4* konnte in dem hier untersuchten Setting keine behandlungs- oder genotypabhängige Regulation nachgewiesen werden (Abb. 14 B-C). Insgesamt zeigte sich kein relevanter Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Expression von *Myc*, *Mef2c* und *Gata4* unter AngII Infusion.



### Abb. 14: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Expression prohypertropher Transkriptionsfaktoren in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (A) *Myc*, (B) *Mef2c* und (C) *Gata4* in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=6-9); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Wie in Tab. 23 dargestellt, konnte die Suppression der AngII-induzierten Reexpression von *Nppb*, *Myh7* und darüber hinaus von *Nppa* in *Gpr55* deletierten Herzen auch in der männlichen Kohorte nachgewiesen werden. Diese *Gpr55* KO abhängige Regulation scheint somit geschlechtsunabhängig. Dagegen führte die AngII Infusion im Gegensatz zur weiblichen Kohorte nur in Männchen in Abwesenheit von *Gpr55* zu einer Zunahme der *Myc* Transkription. Mit Ausnahme dieser geschlechtsabhängigen diskreten Differenz der Expression von *Myc* ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede der AngII-induzierten Expression prohypertropher Transkriptionsfaktoren zwischen der männlichen und weiblichen Kohorte.

**Tab. 23: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die hypertrophe Genexpression in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

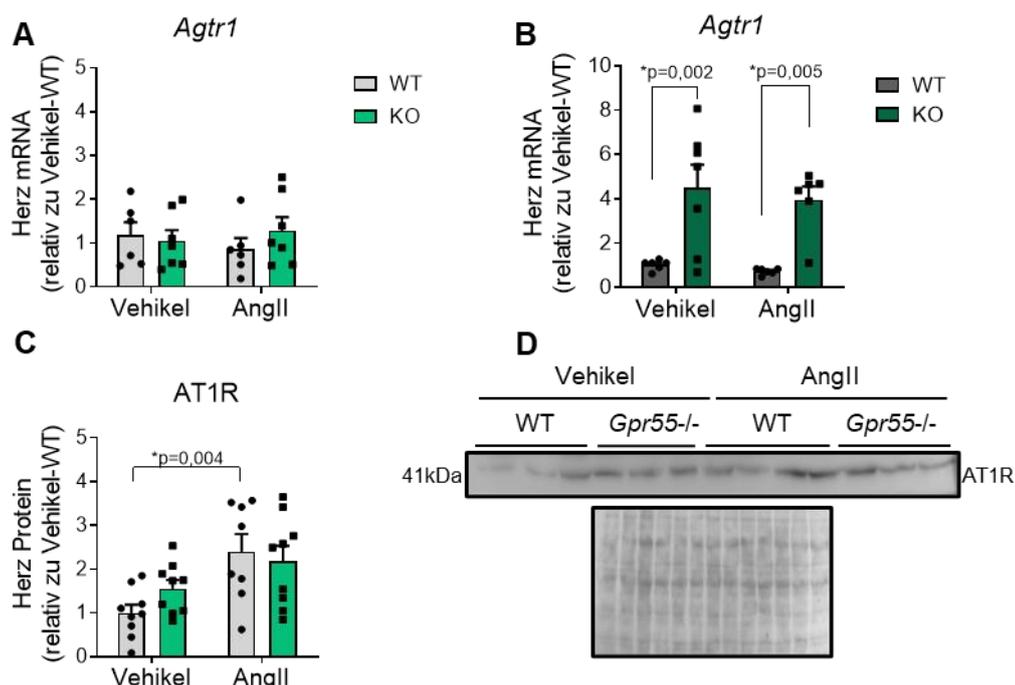
	WT Vehikel (n=4-6)	KO Vehikel (n=4-6)	WT AngII (n=4-7)	KO AngII (n=4-7)
<i>Nppa</i>	1,12 ± 0,34	1,07 ± 0,29	2,29 ± 0,41 *	1,52 ± 0,12
<i>Nppb</i>	1,03 ± 0,10	0,79 ± 0,12	2,52 ± 0,43 *	1,28 ± 0,20 #
<i>Myh7</i>	1,07 ± 0,17	1,65 ± 0,34	2,42 ± 0,53 *	1,67 ± 0,26
<i>Myh7/Myh6</i>	1,16 ± 0,30	1,49 ± 0,39	3,90 ± 1,34 *	2,06 ± 0,34
<i>Myc</i>	1,08 ± 0,20	1,05 ± 0,17	1,21 ± 0,22	1,89 ± 0,26 *
<i>Gata4</i>	1,02 ± 0,10	1,05 ± 0,25	0,65 ± 0,10	0,73 ± 0,06

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05 AngII vs. Vehikel; #p<0,05 KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren wird durch die Aktivierung prohypertropher Signalkaskaden induziert. Zu den, dem AT1R nachgeschalteten, Proteinkinasen gehören die MAP-Kinasen ERK und p38 sowie AKT. Um näher zu untersuchen, an welcher Stelle GPR55 Einfluss auf die prohypertrophe Signalkaskade nimmt, wurde die Expression des *Agtr1* (AngiotensinII-Rezeptor Typ 1) und der genannten Proteinkinasen untersucht.

Abb. 15 klärt zunächst die Frage, ob die prohypertrophe Signaltransduktion in Abwesenheit von GPR55 durch eine veränderte Expression des AT1R (*Agtr1*; AngiotensinII-Rezeptor Typ 1) moduliert wird. In der weiblichen Kohorte blieb die kardiale Expression des *Agtr1* auf mRNA-Ebene unbeeinflusst von Behandlung und Genotyp (Abb. 15 A). Dagegen zeigte sich auf Proteinebene ein Anstieg der AT1R Expression durch die AngII Infusion in WT Mäusen (Abb. 15 C), möglicherweise bedingt durch eine positive Rückkopplung auf die Rezeptorexpression

durch dessen Substrat. In männlichen KO Herzen wurde unabhängig von AngII eine im Vergleich zu WT Herzen signifikant erhöhte *Agtr1* mRNA Expression gemessen (Abb. 15 B). In Zusammenschau mit der oben aufgeführten Expressionsanalyse der, dem AT1R nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren ergab sich jedoch kein Hinweis auf ein verstärktes AT1R Signaling in männlichen KO Herzen. Bei zudem im Vergleich zur weiblichen Kohorte milderer Ausprägung des strukturellen kardialen Remodelings in Männchen, konzentriert sich die im Folgenden aufgeführte weitere Analyse der prohypertrophen Signalwege auf die weibliche Kohorte.



### Abb. 15: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die AT1R Expression in der AngII-induzierten LV Hypertrophie

Mittels qPCR quantifizierte kardiale *Agtr1* mRNA Expression in (A) weiblichen und (B) männlichen KO und WT Mäusen (n=6-7) sowie mittels (C) Western Blot quantifizierte kardiale Proteinexpression des AT1R in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (n=8-9). (D) Exemplarischer Western Blot des AT1R und korrespondierende Ponceau Rot Aufnahme der Membran.

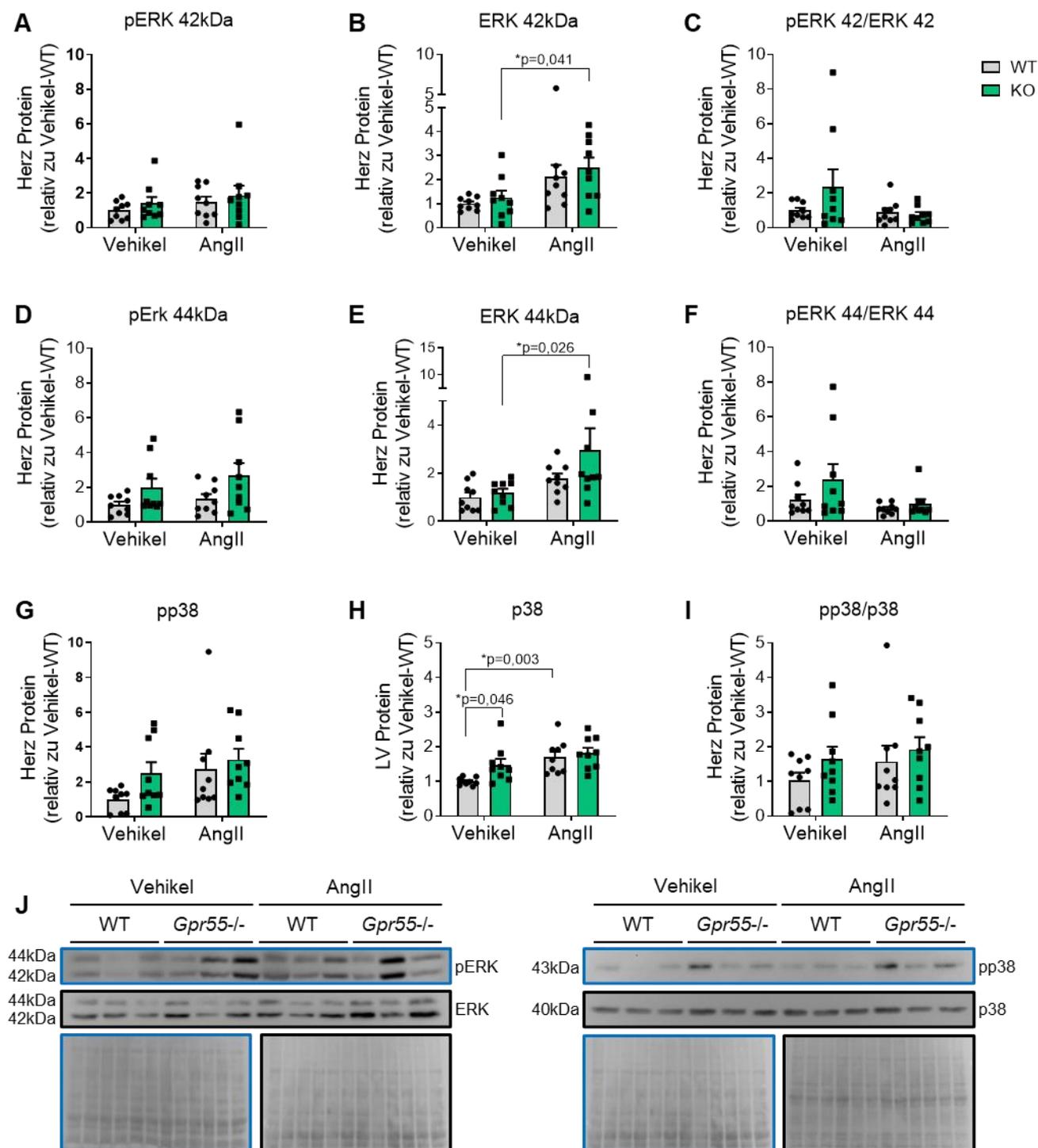
Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Eine Proteinexpressionsanalyse der MAP-Kinasen ERK und p38 in Weibchen ist in Abb. 16 aufgeführt. Dabei wurde jeweils das Gesamtprotein sowie die phosphorylierte Form bestimmt. Die Proteinkinasen ERK und p38 spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Zellwachstum, daneben wird die MAP-Kinase p38 als proapoptotisch beschrieben. Nach AngII Gabe stieg die ERK Gesamtproteinexpression beider Isoformen in KO Herzen signifikant (Abb. 16 B, E). Durch die AngII Infusion erfolgte zudem ein signifikanter Anstieg der p38 Gesamtproteinexpression in WT Herzen, während diese in KO Herzen schon unter Vehikelbedingungen

---

heraufreguliert war (Abb. 16 H). Dagegen zeigten sich die aktivierten Formen, sowohl dargestellt als phosphorylierte Form (pERK, pp38) als auch als Anteil des phosphorylierten Proteins am Gesamtprotein, von ERK und p38 in beiden Genotypen weitgehend unbeeinflusst von AngII (Abb. 16 A, C, D, F, G, I). Somit wurde die erwartete AngII-induzierte Heraufregulation der MAP-Kinasen durch den Anstieg des Gesamtproteins von ERK und p38 reflektiert. Dabei zeigte sich jedoch kein Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Aktivierung der MAP-Kinasen und somit kein Hinweis auf eine Rolle der MAP-Kinasen als Effektoren von GPR55 in der maladap-tiven Hypertrophie.

## Ergebnisse



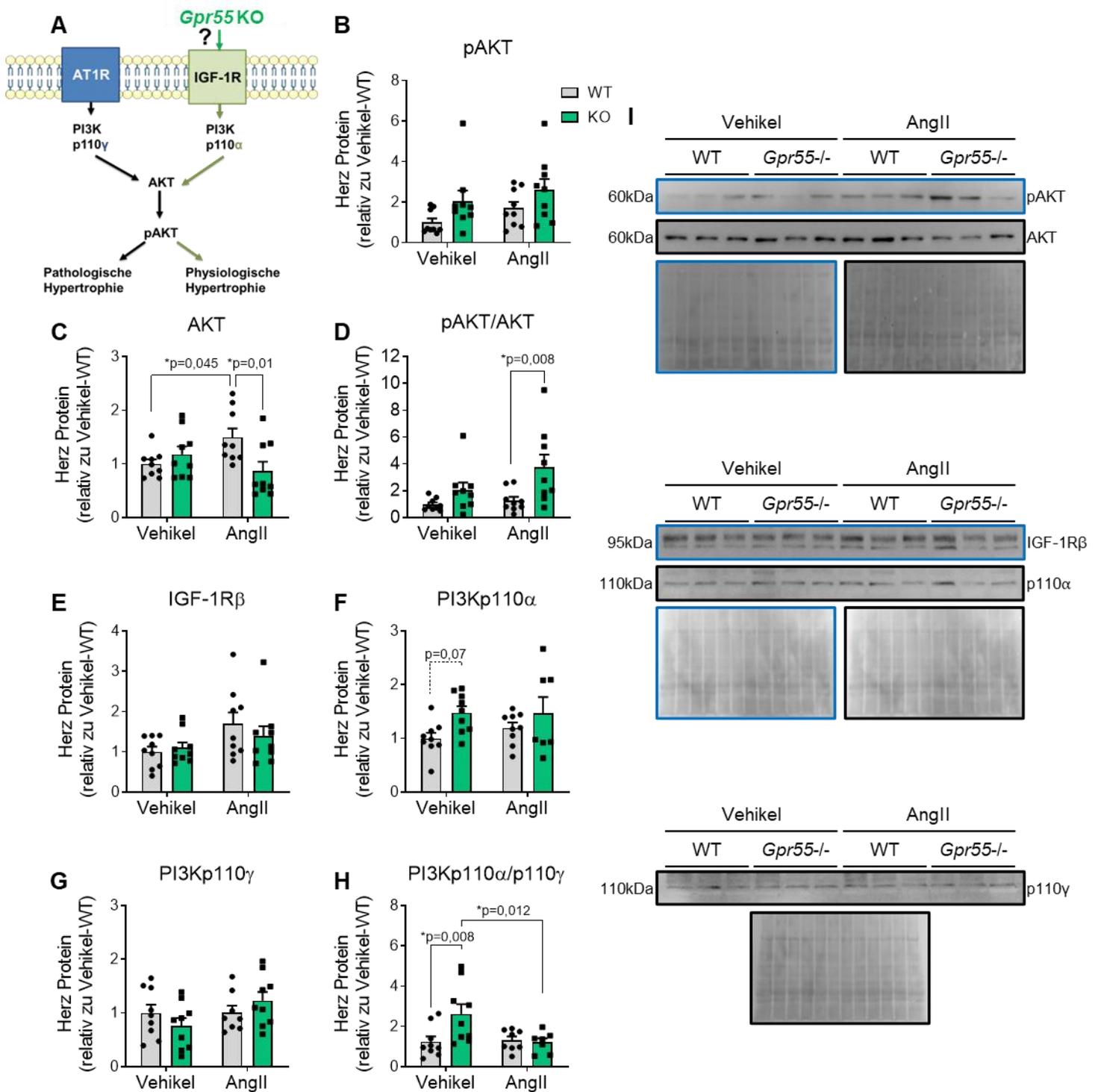
**Abb. 16: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Aktivierung prohypertropher MAP-Kinasen in der AngII-induzierten LV Hypertrophie**

Mittels Western Blot quantifizierte kardiale Proteinexpression der 42kDa Isoform von (A) pERK, (B) ERK und der daraus berechneten (C) pERK/ERK Ratio sowie der 44kDa Isoform von (D) pERK, (E) ERK und (F) deren pERK/ERK Ratio sowie die kardiale Proteinexpression von (G) pp38, (H) p38 und der (I) pp38/p38-Ratio in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle. (J) Exemplarische Western Blots der gezeigten Proteine und korrespondierende Ponceau Rot Aufnahmen der Membranen.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=9); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

---

Neben den MAP-Kinasen ERK und p38 ist AKT an der Induktion der pathologischen Hypertrophie beteiligt, vermittelt aber auch zahlreiche adaptive Effekte. AngII führte zur Heraufregulation der kardialen AKT Gesamtproteinexpression in WT, nicht aber in KO Herzen (Abb. 17 C). Dagegen war nach AngII Infusion der phosphorylierte, aktivierte Anteil von AKT (pAKT) in KO Herzen gegenüber WT Herzen signifikant erhöht. Im Rahmen der pathologischen Hypertrophie wird AKT nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch die p110 $\gamma$  Untereinheit der PI3K aktiviert. AKT zählt aber auch zu den zentralen Regulatoren der physiologischen Hypertrophie, bei der es über den IGF-1R vermittelten Signalweg und die p110 $\alpha$  Untereinheit der PI3K zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von AKT kommt. Um die Frage zu klären, über welchen der Signalwege AKT hier am ehesten aktiviert wurde, wurde die kardiale IGF-1R, PI3Kp110 $\alpha$  und PI3Kp110 $\gamma$  Expression im Western Blot bestimmt (Abb. 17 E-H). Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der IGF-1R Expression, der PI3Kp110 $\alpha$  Expression und der PI3Kp110 $\gamma$  Expression zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Es konnte lediglich eine tendenzielle Erhöhung ( $p=0,07$ ) der PI3Kp110 $\alpha$  Expression in KO Herzen unter Vehikelbedingungen beobachtet werden. Diese Regulation verdeutlichte sich nach Berechnung des Expressionsverhältnisses der p110 $\alpha$  zur p110 $\gamma$  Untereinheit der PI3K.



**Abb. 17: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf adaptives und maladaptives AKT Signaling in der AngII-induzierten LV Hypertrophie**

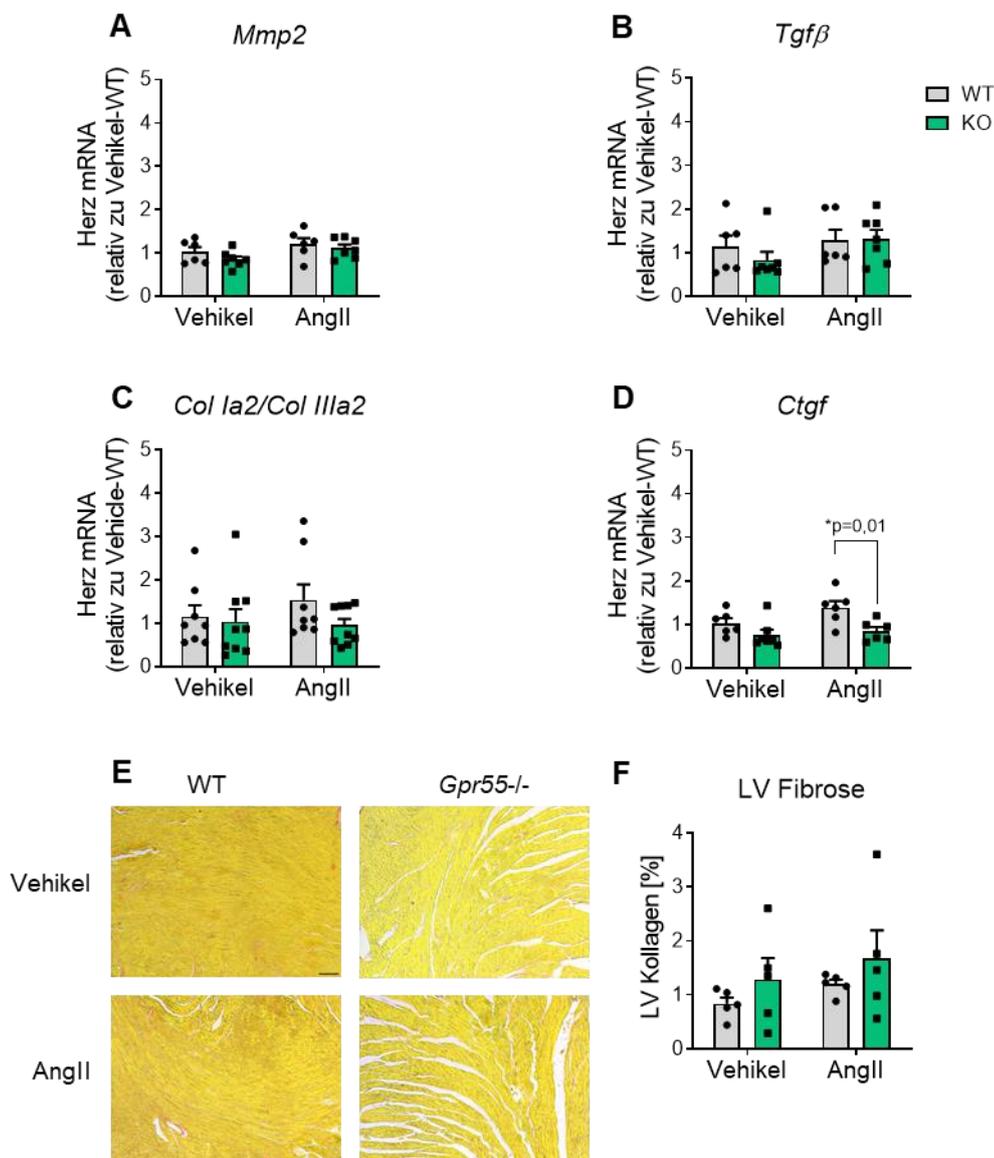
(A) Schematische Darstellung der AKT aktivierenden Signalwege im Rahmen der pathologischen und physiologischen Hypertrophie und hypothetische Induktion des IGF-1R-PI3Kp110 $\alpha$  Signalwegs durch die *Gpr55* Deletion. Mittels Western Blot quantifizierte kardiale Proteinexpression von (B) pAKT, (C) AKT und (D) der daraus berechneten pAKT/AKT Ratio sowie die kardiale Proteinexpression von (E) IGF-1R $\beta$ , (F) PI3Kp110 $\alpha$  und (G) PI3Kp110 $\gamma$  und (H) die daraus berechnete PI3Kp110 $\alpha$ /p110 $\gamma$ -Ratio in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (I) Exemplarische Western Blots der gezeigten Proteine und korrespondierende Ponceau Rot Aufnahmen der Membranen.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=8-9); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. ((Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Zusammenfassend scheint eine Deletion von *Gpr55* in Weibchen übereinstimmend mit dem basal erhöhten Herzgewicht schon per se eine Heraufregulation der wachstumsfördernden MAP-Kinase p38 zu bewirken. In Folge der AngII Infusion als pathologischem Stimulus kam es in *Gpr55* deletierten Herzen zur Suppression des fetalen Genprogramms als klassischem Hypertrophiemarker. Dies weist auf eine Rolle von GPR55 im prohypertrophen kardiomyozytären Signalling hin. Dabei zeigte sich kein Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Expression und Aktivierung der MAP-Kinasen nach AngII Infusion. Jedoch wurde die Hypertrophieinduktion infolge der AngII Infusion nur in Abwesenheit von *Gpr55* über eine Aktivierung von AKT getriggert.

#### **5.4 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die profibrotische Genexpression in der AngII-induzierten Hypertrophie**

Die verstärkte Aktivierung der oben beschriebenen prohypertrophen Signalwege induziert nicht nur eine Kardiomyozytenhypertrophie, sondern führt auch zu einer Produktion profibrotischer Faktoren. Die resultierende myokardiale Fibrose bedingt eine erhöhte Steifigkeit des Myokards und Abnahme der kardialen Funktion. Um zu prüfen, ob die *Gpr55* Deletion hierin eine Rolle spielt, wurde eine mRNA Expressionsanalyse ausgewählter profibrotischer Gene durchgeführt (Abb. 18). Die Expression der *Mmp2* blieb in den hier untersuchten Gruppen unverändert (Abb. 18 A). Das Gleiche galt für den profibrotischen Faktor *Tgf $\beta$*  (Abb. 18 B). Passend zu der fehlenden Heraufregulation von *Mmp2* und *Tgf $\beta$*  durch die AngII Infusion war auch das Verhältnis der *Kollagen I* zu *Kollagen III* Expression unbeeinflusst von Behandlung und Genotyp (Abb. 18 C). Infolge der AngII Infusion war einzig eine erhöhte Expression des profibrotischen Faktors *Ctgf* in WT Herzen gegenüber KO Herzen messbar (Abb. 18 D). Die Suppression von *Ctgf* deutet auf einen antifibrotischen Effekt der *Gpr55* Deletion hin. Passend zu dem fehlenden Anstieg der Kollagen Expression in AngII behandelten Herzen konnte histologisch unabhängig vom Genotyp keine myokardiale Fibrose nachgewiesen werden (Abb. 18 E, F). Dies unterstreicht das kompensatorische Stadium der hier untersuchten LV Hypertrophie.



**Abb. 18: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale profibrotische Genexpression und LV Fibrose in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen**

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (A) *Mmp2*, (B) *Tgfβ*, (C) der *Col I/Col III-Ratio* und (D) *Ctgf* in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (n=6-9). (E) Repräsentative Aufnahmen der Sirius Red gefärbten, mittventrikulären Herzschnitte in 10-facher Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu$ m. (F) LV Kollagenanteil in allen Behandlungsgruppen (n=5). Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05.

((Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Eine in männlichen Versuchstieren durchgeführte Expressionsanalyse (Tab. 24) spiegelte die Ergebnisse der weiblichen Kohorte wider. Die Expressionsmuster von *Mmp2*, *Tgfβ* und die *Col I/Col III-Ratio* blieben ebenfalls unbeeinflusst von Genotyp oder Behandlung. Eine in männlichen WT Herzen beobachtete milde Heraufregulation von *Ctgf* nach AngII Infusion wurde durch die *Gpr55* Deletion inhibiert. Zusammenfassend zeigte sich in der hier untersuchten kompensierten Hypertrophie kein deutlicher Anstieg der profibrotischen Genexpression. Ausgenommen davon war eine milde Heraufregulation von *Ctgf*, die durch die *Gpr55* Deletion in

beiden untersuchten Geschlechtern inhibiert wurde. Diese Inhibition einer Heraufregulation von *Ctgf* in KO Mäusen kann nicht nur der Entwicklung einer kardialen Fibrose entgegenwirken, sondern auch auf eine Aufrechterhaltung der kardialen Funktion hindeuten.

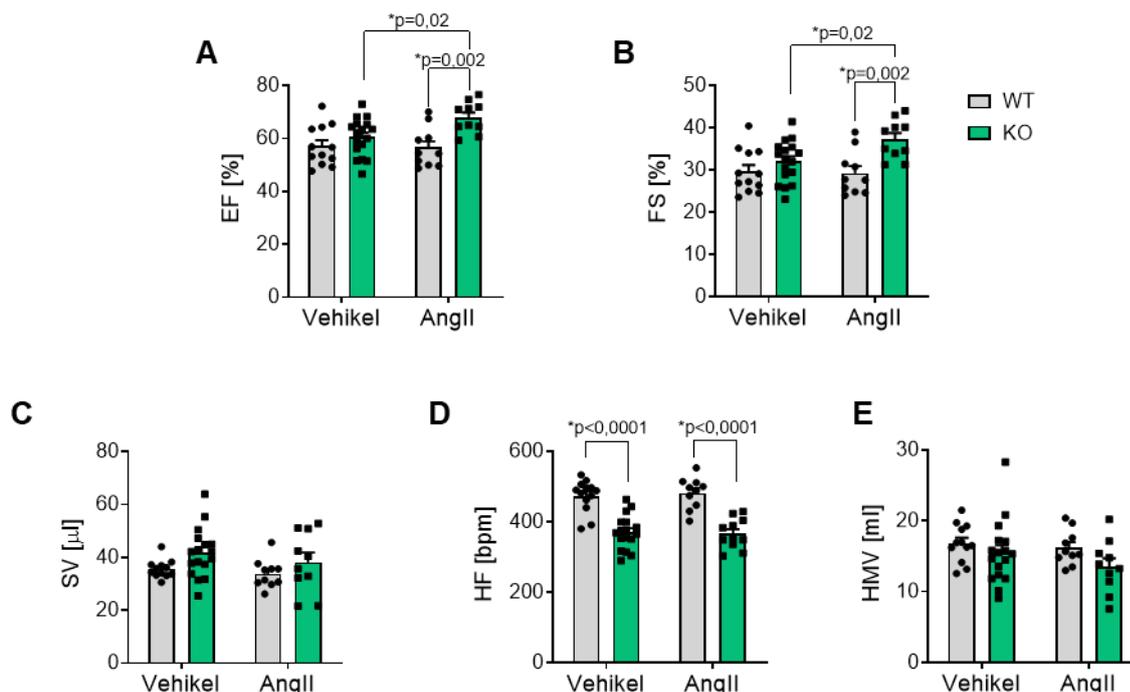
**Tab. 24: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale profibrotische Genexpression in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=7)	WT AngII (n=6)	KO AngII (n=6-7)
<i>Mmp2</i>	1,05 ± 0,13	1,24 ± 0,18	1,58 ± 0,17	1,50 ± 0,15
<i>Tgfβ</i>	1,06 ± 0,16	1,26 ± 0,18	1,32 ± 0,21	1,55 ± 0,14
<i>Col 1a2/Col 3a2</i>	1,20 ± 0,37	1,18 ± 0,18	1,32 ± 0,42	1,52 ± 0,23
<i>Ctgf</i>	1,02 ± 0,08	0,95 ± 0,19	3,19 ± 0,81 *	1,44 ± 0,44 #

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05 AngII vs. Vehikel; #p<0,05 KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

### 5.5 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Funktion in der AngII-induzierten Hypertrophie

Die Ausbildung einer kompensatorischen linksventrikulären konzentrischen Hypertrophie dient der Abnahme der Wandspannung und der Erhaltung der kardialen Funktion infolge einer erhöhten Nachlast. Um die Veränderung der kardialen Funktion nach 28-tägiger AngII Gabe und *Gpr55* Deletion zu bestimmen, wurden echokardiographisch zunächst in der weiblichen Kohorte die in Abb. 19 dargestellten kardialen Funktionsparameter, Auswurf fraktion, Verkürzungsfraction, Schlagvolumen, Herzfrequenz und Herzzeitminutenvolumen, bestimmt.



**Abb. 19: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Funktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen**

Echokardiographische Erhebung von (A) Ejektionsfraktion (EF), (B) Verkürzungsfraktion (FS), (C) Schlagvolumen (SV), (D) Herzfrequenz (HF) und (E) Herzzeitminutenvolumen (HMV) in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10-17); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Auswurf- und Verkürzungsfraktion sind wichtige Parameter für die linksventrikuläre Kontraktilität. Die Untersuchung der LV Funktion der WT Herzen nach AngII Infusion ergab eine erhaltene Auswurf- und Verkürzungsfraktion, als Ausdruck einer, in dem hier untersuchten Stadium der Hypertrophie, noch kompensierten Druckbelastung. In Abwesenheit von *Gpr55* kam es in Folge der AngII Behandlung sogar zu einer signifikanten Zunahme von Auswurf- und Verkürzungsfraktion, die damit gegenüber der WT Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Abb. 19 A-B). Somit resultierte die AngII Infusion in KO Herzen in einer erhöhten Kontraktilität bzw. Inotropie. Die Herzfrequenz, als Parameter der Chronotropie, blieb dagegen in beiden Genotypen unbeeinflusst von AngII, war jedoch in Abwesenheit von *Gpr55* deutlich erniedrigt (Abb. 19 D). Infolge der AngII Infusion kam es jedoch trotz der Kontraktilitätszunahme in KO Herzen nicht zu einem Anstieg des Schlagvolumens (Abb. 19 C). Dies begründet sich darin, dass, wie zuvor beschrieben, die AngII Infusion in *Gpr55* deletierten Herzen nicht nur eine Abnahme des systolischen Volumens, sondern auch eine Verkleinerung des diastolischen Volumens und damit der linksventrikulären Füllung bewirkte. Daraus resultierte ein unverändertes Herzzeitminutenvolumen in GPR55 KO Mäusen gegenüber der WT Kontrollgruppe nach AngII Infusion (Abb.19 E). Dies legt nahe, dass die AngII bedingte Erhöhung der Kontraktilität in KO Herzen

möglicherweise der Aufrechterhaltung des Schlagvolumens und Kompensation der Bradykardie in Abwesenheit von *Gpr55* dient. Die Resultate der hier dargestellten kardialen Funktionsanalyse konnten in der männlichen Kohorte in gleicher Weise bestätigt werden (Tab. 25).

**Tab. 25: Echokardiographische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Funktion in der Angll-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=16)	WT Angll (n=6)	KO Angll (n=14)
EF [%]	52,3 ± 2,1	58,9 ± 2,2	50,0 ± 3,1	68,2 ± 1,9 *#
FS [%]	26,6 ± 1,3	31,1 ± 1,5	25,2 ± 1,8	37,7 ± 1,5 *#
SV [μl]	42,9 ± 1,1	42,0 ± 2,9	36,1 ± 3,9	39,5 ± 2,1
HF [min <sup>-1</sup> ]	459 ± 23	391 ± 11 #	454 ± 16	406 ± 11
HMV [ml]	19,7 ± 1,2	16,3 ± 1,0	16,2 ± 1,4	16,1 ± 1,0

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05 Angll vs. Vehikel; #p<0,05 KO vs. WT.

Um die echokardiographisch erhobene Funktionsanalyse mit der klinischen Symptomatik zu korrelieren und ein Lungenödem auszuschließen, wurde der Flüssigkeitsgehalt der Lunge durch die gravimetrische Messung von Lungenfeucht- und Lungentrockengewicht bestimmt (Tab. 26). Passend zu der erhaltenen kardialen Funktion war dieser in Weibchen in allen untersuchten Gruppen konstant. Dagegen zeigte sich in Männchen unter Vehikelbedingungen in KO Lungen mehr Flüssigkeit im Vergleich zu WT Lungen. Aufgrund der erhaltenen basalen Herzfunktion in männlichen KO Mäusen ist diese Ansammlung von Flüssigkeit jedoch eher nicht auf eine pulmonale Stauung zurückzuführen. Vielmehr könnten hier andere Faktoren, wie eine erhöhte Permeabilität des Endothels, im Vordergrund stehen.

**Tab. 26: Gravimetrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf den Flüssigkeitsgehalt der Lunge in der Angll-induzierten LV Hypertrophie**

Weibchen	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=8-9)	WT Angll (n=5)	KO Angll (n=7-8)
Lungengewicht feucht [mg]	151,2 ± 8,0	145,4 ± 11,4	155,8 ± 10,8	163,9 ± 6,7
Lungengewicht trocken [mg]	27,8 ± 1,4	31,4 ± 1,0	30,6 ± 2,3	30,3 ± 0,6
Lungen Flüssigkeit [mg]	123,3 ± 8,9	113,8 ± 10,7	125,2 ± 11,5	133,6 ± 6,8

## Ergebnisse

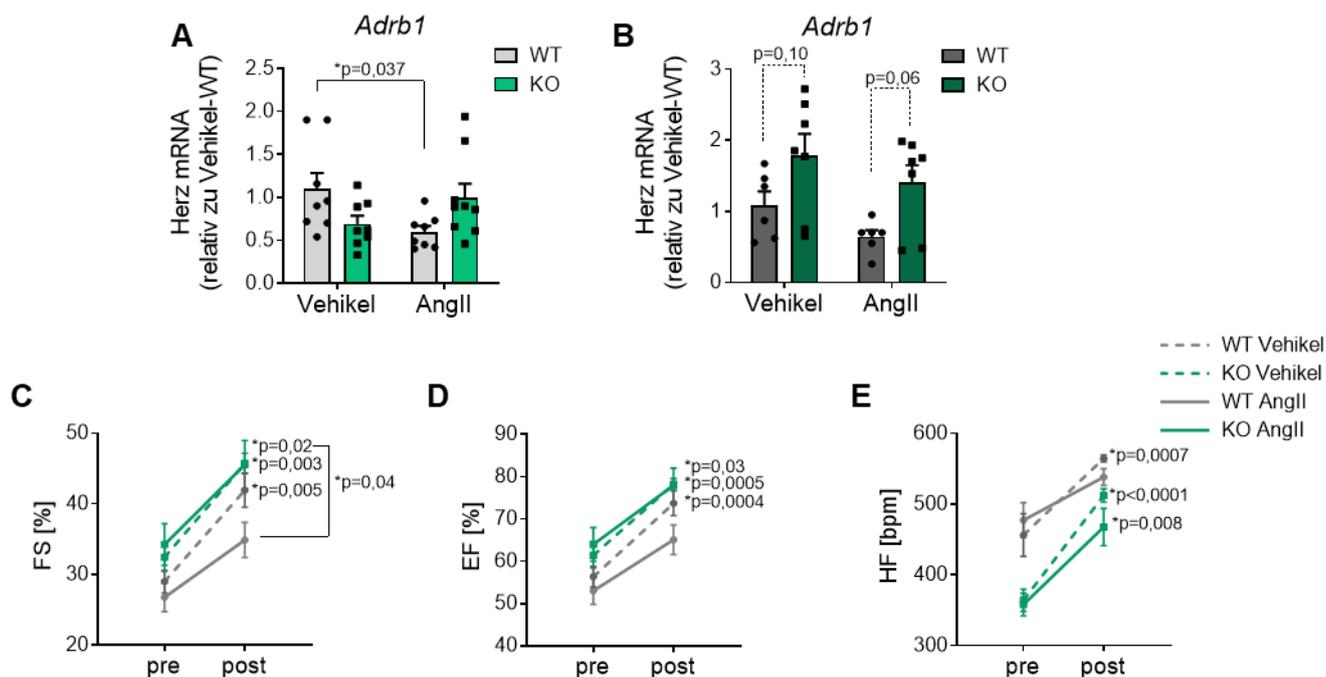
Männchen	WT Vehikel (n=5)	KO Vehikel (n=6-8)	WT AngII (n=5-6)	KO AngII (n=5-7)
Lungengewicht feucht [mg]	146,6 ± 2,0	181,7 ± 11,9 #	162,4 ± 9,3	179,0 ± 13,6
Lungengewicht trocken [mg]	33,0 ± 0,8	30,5 ± 0,9	33,8 ± 1,5	32,4 ± 0,7
Lungen Flüssigkeit [mg]	113,8 ± 2,9	151,2 ± 11,9 #	128,0 ± 10,0	146,4 ± 14,1

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; #p<0,05 KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Eine zentrale Rolle in der Regulation von Inotropie und Chronotropie spielt das adrenerge System. Adrenalin bindet an den  $\beta$ 1-Rezeptor und führt so zu einer Steigerung der Kontraktilität und Herzfrequenz. Um zu überprüfen, ob die *Gpr55* Deletion Einfluss auf das adrenerge Signalling nimmt, wurde zunächst die  $\beta$ 1-Adrenozeptor Expression auf mRNA Ebene bestimmt und anschließend in einer Subgruppe der Studienkohorte die sympathoadrenerge Reaktion in funktionellen Stresstests untersucht (Abb. 20). In weiblichen WT Mäusen kam es zur Herabregulation des  $\beta$ 1-Adrenozeptors (*Adrb1*) nach AngII Behandlung (Abb. 20 A). Dies kann im Sinne einer Desensibilisierung infolge der durch die kontinuierliche AngII Infusion induzierten dauerhaften Aktivierung des sympathischen adrenergen Systems gewertet werden. Eine Desensibilisierung des  $\beta$ 1-Adrenozeptors konnte dagegen in Abwesenheit von *Gpr55* nicht nachgewiesen werden. In männlichen KO Herzen konnte zwar keine signifikant veränderte  $\beta$ 1-Adrenozeptor (*Adrb1*) mRNA Expression beobachtet werden, die Mittelwerte der Gruppen deuten jedoch auf eine gegenüber der WT Kontrollgruppe erhöhte Rezeptorexpression unter Vehikel (p=0,10) und AngII Infusion (p=0,06) hin (Abb. 20 B). Um weiter zu evaluieren, ob sich die veränderte  $\beta$ 1-Rezeptorexpression in *Gpr55* deletierten Herzen auch funktionell widerspiegelt, wurden Stresstests mit dem  $\beta$ 1-Agonisten Dobutamin in der weiblichen Kohorte durchgeführt (Abb. 20 C-E). Betrachtet man die Messergebnisse der Funktionsparameter, Wanddicken und Kavitäten vor Dobutamininjektion zwischen den Gruppen entsprechen diese, wie zu erwarten, der zuvor dargestellten echokardiographischen Analyse des strukturellen und funktionellen Remodelings (Abb.12, 19). Zum Teil zeichnen sich dabei lediglich dieselben Tendenzen ab, erreichen in der hier vorliegenden Auswertung aber keine Signifikanz. Dies lässt sich am ehesten auf die deutlich niedrigeren n-Zahlen der Dobutamin Stresstest Messungen zurückführen. Beide Genotypen zeigten unter Vehikelbedingungen nach Dobutamininjektion eine signifikante Steigerung der Herzfrequenz und somit der Chronotropie sowie der Auswurf- und Verkürzungsfraction als Parameter der Inotropie. Dieser positiv chronotrope und inotrope Effekt von Dobutamin konnte nach AngII Behandlung weiterhin in der KO Gruppe beobachtet werden. Dagegen waren in der WT Gruppe sowohl der Frequenzanstieg als auch die Steigerung

## Ergebnisse

der Kontraktilitätsparameter durch Dobutamin deutlich abgeschwächt, hinweisend auf eine Reduktion der  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit (Abb. 20 C-E). Zusammenfassend zeigte sich in der WT Kontrollgruppe nach AngII Infusion eine Herabregulation des  $\beta 1$ -Adrenozeptors sowie ein reduziertes Ansprechen von Chronotropie und Inotropie auf die Stimulation mit Dobutamin. Dagegen deuten die beobachteten Ergebnisse an, dass die *Gpr55* Deletion eine AngII-induzierte Desensibilisierung der  $\beta 1$ -Adrenozeptoren verhindert und im Erhalt der chronotropen und inotropen Reserve resultiert.



### Abb. 20: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in der AngII-induzierten LV Hypertrophie

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression des  $\beta 1$ -Adrenozeptors (*Adrb1*) in (A) weiblichen und (B) männlichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (n=6-9). Echokardiographische Aufnahme von (C) Herzfrequenz (HF), (D) Verkürzungsfraktion (FS) und (E) Ejektionsfraktion (EF) vor und nach Dobutamingabe in allen Behandlungsgruppen der weiblichen Kohorte (n=3-5).

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

Die Steigerung der Kontraktilität durch Dobutamin wird durch eine transiente Zunahme der Wanddicken und Verkleinerung der Kavitäten reflektiert (Tab. 27). Der stärkste Dobutamin-induzierte Effekt ergab sich dabei für die LV Hinter- und Vorderwand während der Systole. Hier zeigten die Vehikelgruppen genotypunabhängig eine Zunahme der systolischen Wanddicke nach Dobutamininjektion, die nach AngII Infusion nur noch in der KO Gruppe beobachtet werden konnte. Das gleiche Muster zeigte sich in der Diastole. Dagegen war die Wandverdickung des interventrikulären Septums als Reaktion auf Dobutamin unabhängig von der *Gpr55* Deletion nur angedeutet. Parallel zur Zunahme der Wanddicken kam es zu einer Verkleinerung der Kavitäten. Dabei führte die Dobutamingabe unter Vehikelbedingungen genotypunabhängig zu

einer Verkleinerung von systolischem und diastolischem LV Durchmesser. Gleiches erfolgte in der AngII behandelten KO Gruppe, aber nicht in der korrespondierenden WT Kontrollgruppe. Zusammenfassend bestätigen die Veränderungen der Wanddicken und Kavitäten die erhöhte Kontraktilität nach Dobutamininjektion und die nach AngII Infusion erhaltene  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in Abwesenheit von *Gpr55*.

**Tab. 27: Echokardiographische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die kardiale  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit in der AngII-induzierten LV Hypertrophie mittels Dobutamin Stresstest**

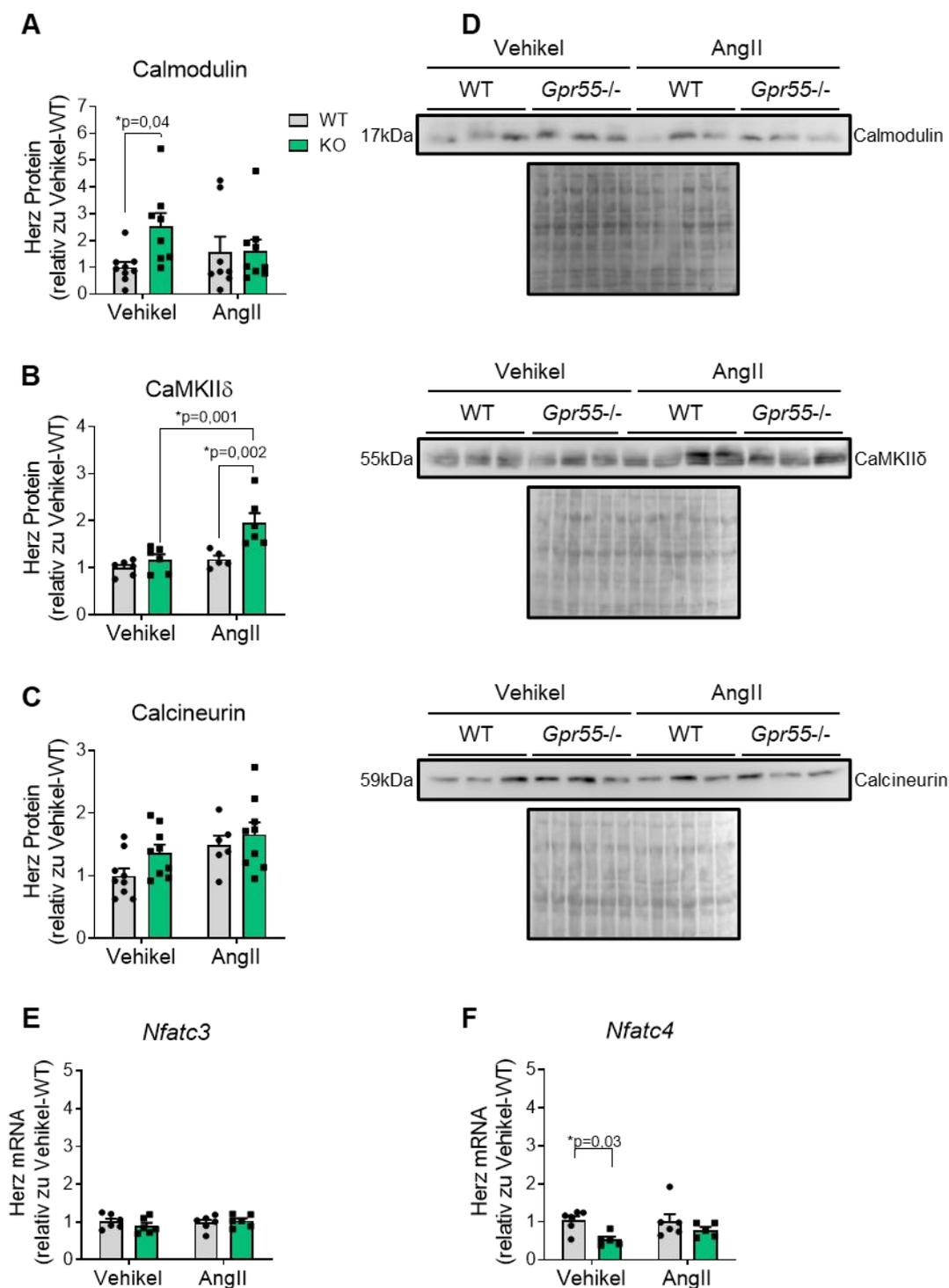
		WT Vehikel (n=5)	KO Vehikel (n=5)	WT AngII (n=2-3)	KO AngII (n=3)
LVPW;d [ $\mu$ m] ± SEM	-	0.739 ± 0.034	0.787 ± 0.062	0.905 ± 0.011	0.947 ± 0.021
	+	0.837 ± 0.041	0.904 ± 0.058 *	0.950 ± 0.051	1.144 ± 0.112 *§
LVPW;s [ $\mu$ m]	-	1.042 ± 0.055	1.102 ± 0.060	1.225 ± 0.037	1.228 ± 0.053
	+	1.241 ± 0.075 *	1.310 ± 0.067 *	1.302 ± 0.032	1.525 ± 0.040 *
IVS;d [ $\mu$ m]	-	0.663 ± 0.028	0.752 ± 0.054	0.832 ± 0.044	0.813 ± 0.084
	+	0.779 ± 0.036	0.876 ± 0.065	0.886 ± 0.053	0.968 ± 0.011
IVS;s [ $\mu$ m]	-	0.958 ± 0.049	1.100 ± 0.067	1.093 ± 0.073	1.203 ± 0.134
	+	1.207 ± 0.053	1.391 ± 0.045 *	1.221 ± 0.108	1.412 ± 0.053
LVAW;d [ $\mu$ m]	-	0.660 ± 0.046	0.747 ± 0.062	0.826 ± 0.048	0.867 ± 0.060
	+	0.766 ± 0.014	0.904 ± 0.044	0.872 ± 0.043	0.991 ± 0.006
LVAW;s [ $\mu$ m]	-	0.936 ± 0.044	1.128 ± 0.067	1.163 ± 0.067	1.273 ± 0.142
	+	1.226 ± 0.056 *	1.438 ± 0.049 *	1.297 ± 0.061	1.545 ± 0.024
LVID;d [ $\mu$ m]	-	3.779 ± 0.059	3.691 ± 0.142	3.692 ± 0.069	3.619 ± 0.394
	+	3.423 ± 0.114 *	3.256 ± 0.106 *	3.434 ± 0.246	3.118 ± 0.451 *
LVID;s [ $\mu$ m]	-	2.686 ± 0.099	2.498 ± 0.142	2.706 ± 0.123	2.385 ± 0.308
	+	1.994 ± 0.135 *	1.764 ± 0.054 *	2.248 ± 0.237	1.720 ± 0.341 *

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; - vor Dobutamingabe; + nach Dobutamingabe; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05 + vs. – Dobutamin; §p< 0,05 AngII + Dobutamin vs. Vehikel+ Dobutamin.

## 5.6 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiomyozytäre $\text{Ca}^{2+}$ abhängige Signaltransduktion

Ein zentraler Mechanismus, der der gesteigerten Kontraktilität infolge eines adrenergen Stimulus zugrunde liegt, ist eine Erhöhung der systolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme in den Kardiomyozyten. Die nach AngII Infusion beobachtete Erhöhung der linksventrikulären Kontraktilität in Abwesenheit von *Gpr55* sowie die im Gegensatz zur WT Kontrollgruppe auch nach AngII Behandlung erhaltene Ansprechbarkeit auf Dobutamin weisen auf eine mögliche Rolle von GPR55 im kardiomyozytären  $\text{Ca}^{2+}$  Handling hin. Wichtige durch  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuerte Signalkaskaden sind dabei der Calmodulin/CaMKII- und der Calmodulin/Calcineurin/NFAT Signalweg.

Die Proteinexpression von Calmodulin, CaMKII und Calcineurin wurde per Western Blot in Proteinlysat weiblicher Herzen bestimmt (Abb. 21). Calmodulin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  bindendes Protein und fungiert als  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor. Die Aktivierung der Proteinkinasen Calcineurin und CaMKII ist abhängig von der Bindung an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin Komplex (33). Die Expression von Calmodulin war in der KO Gruppe unter Vehikel Behandlung signifikant höher im Vergleich zur WT Kontrollgruppe, während nach AngII Infusion kein genotypabhängiger Unterschied mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 21 A, D). Dagegen blieb die Expression der CaMKII in den Vehikelgruppen unbeeinflusst vom Genotyp. Jedoch bewirkte AngII eine Verdopplung der CaMKII Expression in Abwesenheit von GPR55, nicht aber in der WT Kontrollgruppe (Abb. 21 B, D). Als weitere  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Proteinkinase ist Calcineurin durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFATC3 und NFATC4 an der Entstehung der pathologischen Hypertrophie beteiligt. Trotz der basalen Heraufregulation von Calmodulin in KO Herzen blieb die Proteinexpression von Calcineurin unabhängig von Genotyp und Behandlung (Abb. 21 C, D). In Übereinstimmung damit unterlag die *Nfatc3* Expression keiner Regulation zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 21 E). Die Expression von *Nfatc4* zeigte sich dagegen in der Vehikel behandelten KO Gruppe sogar signifikant erniedrigt gegenüber der WT Kontrollgruppe (Abb. 21 F). Die AngII Infusion resultierte jedoch in der Aufhebung dieses genotypabhängigen Unterschiedes. Zusammenfassend scheint der Calmodulin/Calcineurin/*Nfat* Signalweg in dem hier untersuchten Stadium der pathologischen Hypertrophie genotypunabhängig nicht zu den zentralen prohypertrophen Effektoren zu zählen. Dagegen führte die *Gpr55* Deletion zu einer Heraufregulation der CaMKII in AngII behandelten Herzen sowie per se zu einer erhöhten Proteinexpression des  $\text{Ca}^{2+}$  Sensors Calmodulin, der zahlreiche  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Mechanismen reguliert. Demzufolge deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass GPR55 auch einen Einfluss auf das kardiomyozytäre  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Signalling besitzt.



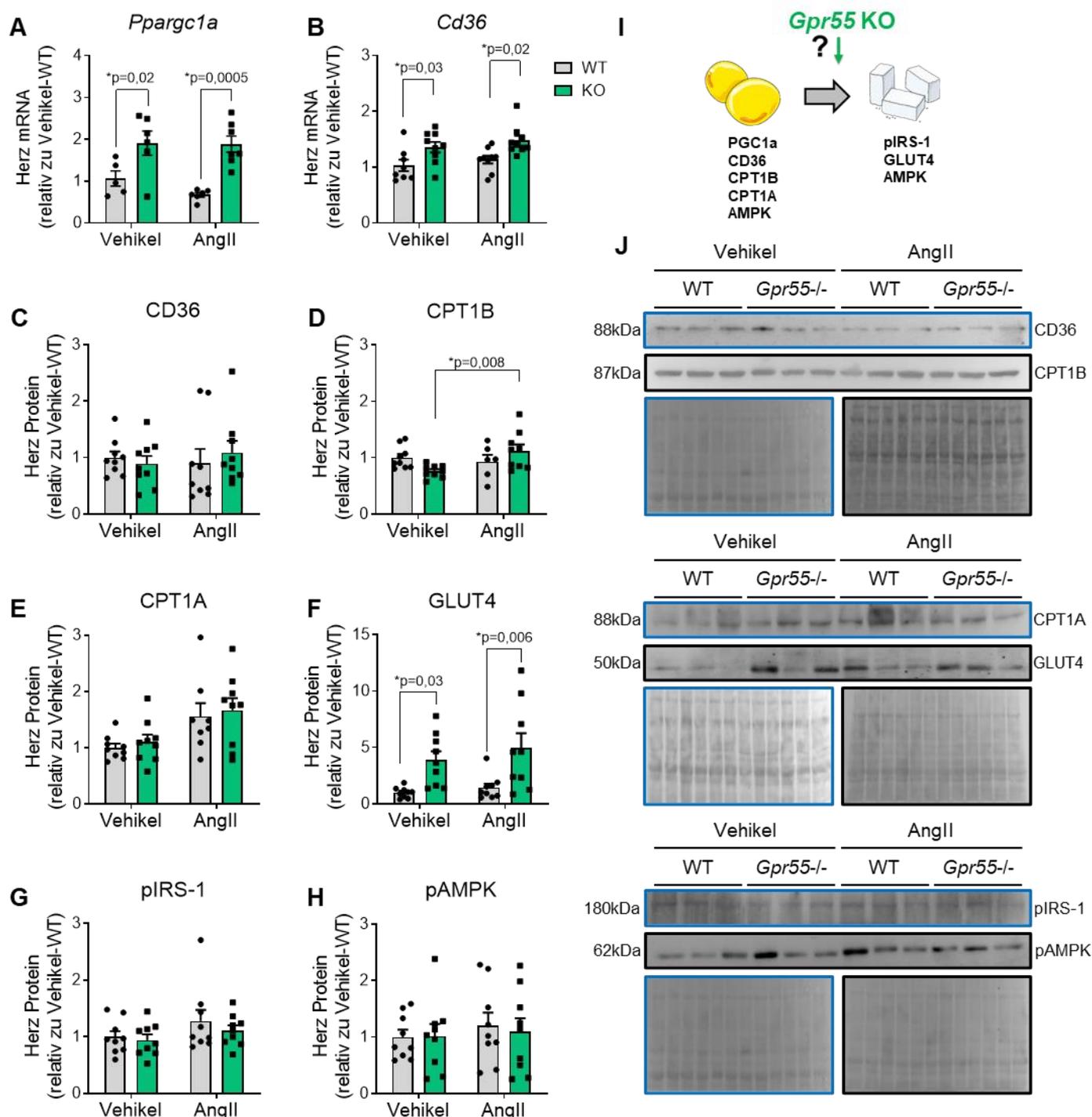
### Abb. 21: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf $Ca^{2+}$ abhängige Signalkaskaden in der AngII-induzierten LV Hypertrophie

Mittels Western Blot quantifizierte kardiale Proteinexpression von (A) Calmodulin, (B) CaMKII und (C) Calcineurin in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (n=5-9) (D) Exemplarische Western Blots der gezeigten Proteine und korrespondierende Ponceau Rot Aufnahmen der Membranen. Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (E) *Nfatc3* und (F) *Nfatc4* in allen Behandlungsgruppen (n=5-6).

Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

## **5.7 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf kardiale metabolische Signalwege in der AngII-induzierten Hypertrophie**

Die Aufrechterhaltung der Herzfunktion im Rahmen der pathologischen Hypertrophie ist abhängig von der kardialen Energieversorgung und somit vom kardialen Metabolismus. Es wurde bereits beschrieben, dass GPR55 die Insulinsekretion fördert und Einfluss auf den Insulinstoffwechsel verschiedener peripherer Gewebe, einschließlich Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel nehmen könnte (95, 96, 106). Eine Rolle von GPR55 im kardialen Metabolismus ist bisher jedoch nicht bekannt. Um dies näher zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Expressionsanalyse wichtiger Regulatoren des kardialen Stoffwechsels in Weibchen durchgeführt. Ein zentraler Regulator des Lipidstoffwechsels, der zudem die mitochondriale Biogenese und damit die oxidative Phosphorylierung fördert, ist der Transkriptionsfaktor PGC1 $\alpha$ . Im Rahmen einer Herzinsuffizienz zählt PGC1 $\alpha$  zudem zu den Regulatoren des Substratshifts von Fettsäuren hin zu Kohlenhydraten.



### Abb. 22: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf kardiale metabolische Signalwege in der AngII-induzierten LV Hypertrophie

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (A) *Ppargc1a* und (B) *Cd36* in weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle (n=5-9). Mittels Western Blot quantifizierte kardiale Proteinexpression von (C) CD36, (D) CPT1B, (E) CPT1A, (F) GLUT4, (G) pIRS-1 (Serin 612) und (H) pAMPK in allen Behandlungsgruppen (n=6-9). (I) Schematische Darstellung eines fraglichen Einflusses der *Gpr55* Deletion auf den Substratshift von Fettsäuren zu Kohlenhydraten und darin involvierte Proteine. (J) Exemplarische Western Blots der gezeigten Proteine und korrespondierende Ponceau Rot Aufnahmen der Membranen.

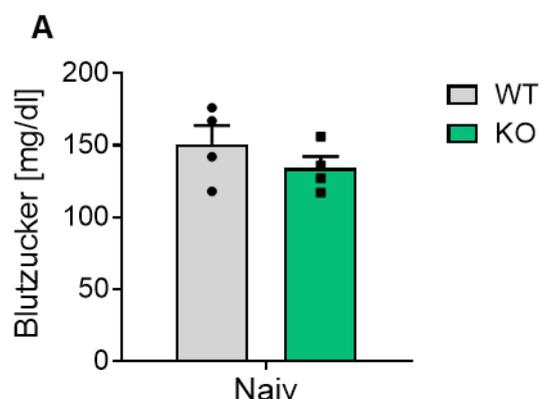
Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

In dem hier untersuchten Stadium der kompensierten Hypertrophie kam es durch die AngII Infusion unabhängig vom Genotyp nicht zu einer Herabregulation von *Ppargc1a*. Im Gegensatz dazu war die *Ppargc1a* Expression in KO Herzen unabhängig von AngII signifikant erhöht im Vergleich zur WT Kontrollgruppe (Abb. 22 A). Um eine veränderte Regulation des Fettstoffwechsels in KO Herzen näher zu untersuchen, wurde die kardiale Expression des Lipidtransporters CD36 gemessen. Auf mRNA Ebene zeigte sich unabhängig von AngII eine signifikant gesteigerte *Cd36* Expression in KO Herzen im Vergleich zur WT Kontrollgruppe (Abb. 22 B). Um dies zu verifizieren, wurde die Proteinexpression von CD36 im Western Blot untersucht. Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 22 C, J). Weiterhin wurde die kardiale Proteinexpression der CPT1 (Carnitin-Palmityltransferase 1), die den Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $\beta$ -Oxidation katalysiert, untersucht. Jedoch blieben sowohl die Expression der im Herzen dominierenden Isoform CPT1b als auch der CPT1a Isoform weitgehend unbeeinflusst von AngII und dem *Gpr55* KO (Abb. 22 D-E, J). Dennoch deutet die erhöhte mRNA Expression von *Ppargc1a* und *Cd36* in Abwesenheit von *Gpr55* auf eine erhöhte Fettsäureoxidation in KO Herzen hin. Auch die infolge der *Gpr55* Deletion unveränderte Proteinexpression von CD36, CPT1b und CPT1a schließt eine erhöhte Aktivität der Transportsysteme und damit eine erhöhte Fettsäure Aufnahme in die Kardiomyozyten bzw. die Mitochondrien nicht aus. Um zu überprüfen, ob die *Gpr55* Deletion auch eine Modulation der Kohlenhydrataufnahme bewirkt, wurde die Expression des Glukose Transporters GLUT4 im Western Blot gemessen. In Abb. 22 F, J ist zu sehen, dass die Proteinexpression von GLUT4 behandlungsunabhängig in KO Herzen gegenüber der WT Kontrollgruppe erhöht war, vereinbar mit einer vermehrten Aufnahme und Verbrennung von Kohlenhydraten in Abwesenheit von *Gpr55*. GLUT4 wird als Insulin-abhängiger Glukose Transporter durch das ihm vorgeschaltete Insulinrezeptorsubstrat aktiviert. Die Expression des am Serin 612 phosphorylierten IRS zeigte sich jedoch unbeeinflusst von AngII oder der *Gpr55* Deletion (Abb. 22 G, J). Eine Regulation des IRS über eine andere Phosphorylierungsstelle ist damit jedoch nicht ausgeschlossen. Zusammengefasst scheinen in Abwesenheit von GPR55 demnach zwei der wichtigsten Energiequellen des Herzens, Kohlenhydrate und Lipide, vermehrt aufgenommen und verstoffwechselt zu werden. Daher wurde die Expression der AMPK, die sowohl den Lipid- als auch den Kohlenhydratstoffwechsel forcieren kann, bestimmt. Die Western Blot Analyse der phosphorylierten AMPK (pAMPK) im Herz zeigte jedoch keine Regulation durch AngII oder den Genotyp (Abb. 22 H, J). Somit scheint eine Aktivierung der AMPK nicht die Ursache für die Modulation des kardialen Metabolismus in *Gpr55* deletierten Herzen zu sein. Es liegt aber nahe, dass die Steigerung des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels einen Mechanismus darstellt, um einen erhöhten

Energieverbrauch zu decken. Darüber hinaus könnte eine hohe Substratflexibilität in Abwesenheit von *Gpr55* dazu beitragen, die beobachtete erhöhte Inotropie nach AngII Behandlung aufrechtzuerhalten.

Um systemische Einflussfaktoren von GPR55 auf den Stoffwechsel aufzudecken, die sich möglicherweise auf den kardialen Metabolismus auswirken, wurden zudem die Blutzuckerwerte (Abb. 23) unter basalen Bedingungen sowie Körpergewichte und Lebergewichte der Versuchstiere analysiert (Tab. 28). In Weibchen konnte dabei kein Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die nach 6 Stunden Nüchternzeit gemessenen Blutzuckerwerte beobachtet werden (Abb. 23 A). Zudem konnte unabhängig vom Geschlecht kein Einfluss von Behandlung oder Genotyp auf das Körpergewicht festgestellt werden. Dagegen war in Abwesenheit von *Gpr55* das Gewicht der Leber in weiblichen Tieren nach AngII Infusion gegenüber WT Tieren signifikant niedriger. Der Gewichtsunterschied war dabei nicht allein auf einen veränderten Flüssigkeitsgehalt des Organs zurückzuführen. Ein reduziertes Lebergewicht in Abwesenheit von *Gpr55* zeigte sich auch in Männchen, hier jedoch unabhängig von der AngII Behandlung. Somit scheint GPR55 einen geschlechts- und behandlungsabhängigen Einfluss auf das Gewicht der Leber zu nehmen. Dies könnte auf eine Rolle von GPR55 im Stoffwechsel und der Speicherkapazität der Leber hindeuten. Zugleich konnte eine Vergrößerung des Organs und damit eine Stauungsleber nach AngII Infusion ausgeschlossen werden.



**Abb. 23: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die nüchtern Blutzuckerwerte in Weibchen**

(A) Gemessene Blutzuckerwerte nach 6 Stunden Nüchternzeit in weiblichen KO und WT Mäusen. Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=4); ungepaarter t-Test; \*p<0,05.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

**Tab. 28: Gravimetrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf Parameter des systemischen Stoffwechsels in der AngII-induzierten LV Hypertrophie**

Weibchen	WT Vehikel (n=6-13)	KO Vehikel (n=7-16)	WT AngII (n=6-10)	KO AngII (n=7-11)
Körpergewicht [g]	22,0 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 0,5	22,0 $\pm$ 0,4	22,3 $\pm$ 0,6

## Ergebnisse

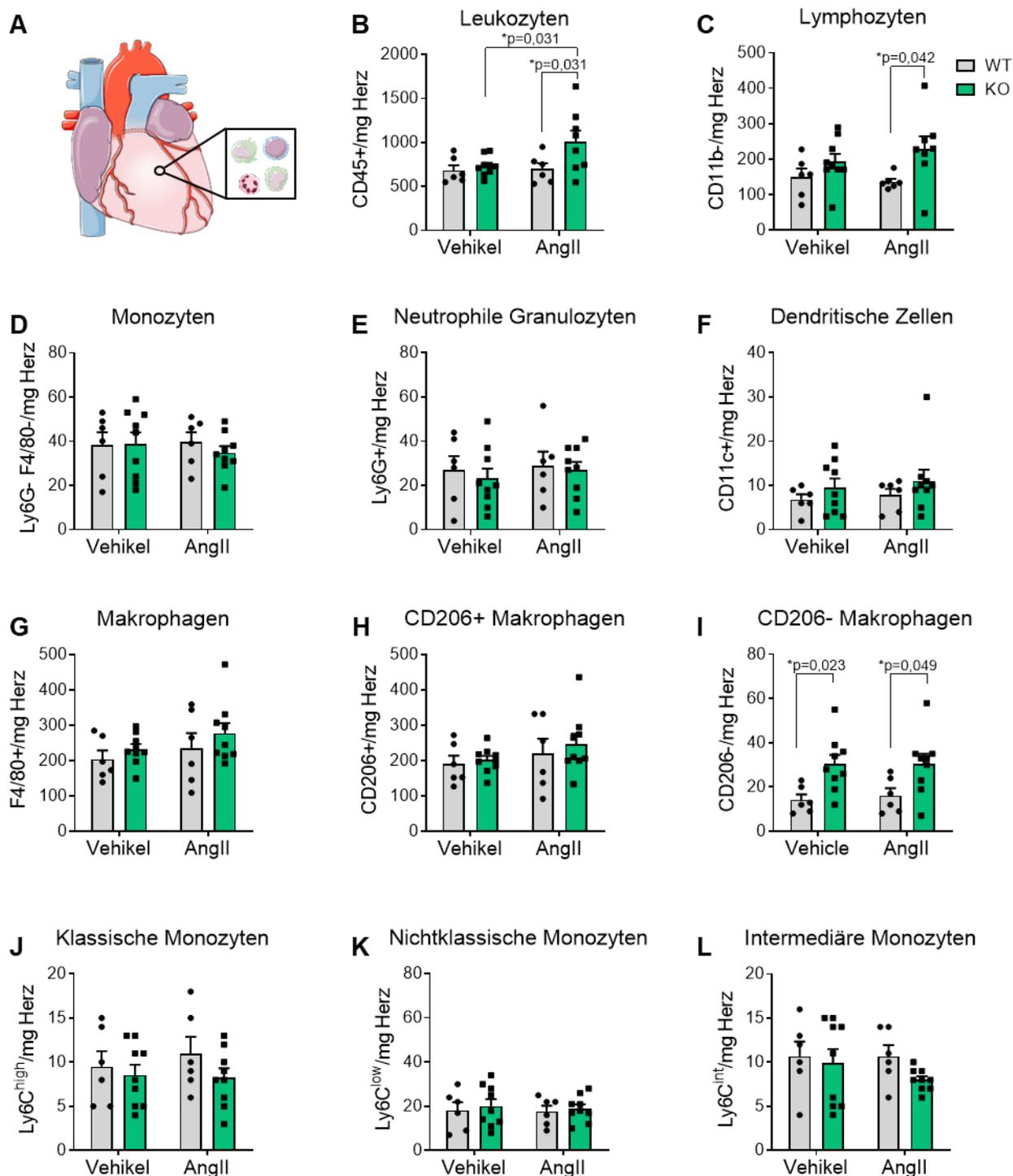
Lebergewicht feucht [mg]	1156,7 ± 42,3	1078,0 ± 87,4	1226,8 ± 44,1	947,6 ± 67,3 #
Lebergewicht trocken [mg]	360,0 ± 13,9	317,1 ± 24,0	367,8 ± 16,8	281,7 ± 15,0 #
<b>Männchen</b>	<b>WT Vehikel (n=5-6)</b>	<b>KO Vehikel (n=7-14)</b>	<b>WT AngII (n=6-8)</b>	<b>KO AngII (n=7-10)</b>
Körpergewicht [g]	28,2 ± 0,9	26,4 ± 0,7	27,4 ± 0,9	27,6 ± 0,8
Lebergewicht feucht [mg]	1470,6 ± 123,0	1047,7 ± 68,6 #	1528,3 ± 81,2	1270,0 ± 78,7
Lebergewicht trocken [mg]	497,0 ± 13,7	333,3 ± 19,2 #	474,0 ± 23,6	372,6 ± 19,0 #

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; #p<0,05 KO vs. WT. (Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

### 5.8 Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten Hypertrophie

Ein weiteres Merkmal der pathologischen Hypertrophie, das zur Progredienz einer Herzinsuffizienz beiträgt, ist eine Entzündungsreaktion im Herzmuskel. Um die Ausprägung der inflammatorischen Reaktion auf die 28-tägige AngII Infusion in *Gpr55* KO und WT Herzen zu ermitteln, wurde eine durchflusszytometrische Analyse zur Untersuchung der Immunzellkomposition sowie eine Expressionsanalyse verschiedener proinflammatorischer Faktoren auf mRNA Ebene durchgeführt. Zunächst sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der weiblichen Versuchstiere in Abb. 24 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abb. 24: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Immunzellpopulation in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen**

(A) Schematische Darstellung von Immunzellen im Herz. Mittels Durchflusszytometrie gemessene Anzahl der (B) Leukozyten, (C) Lymphozyten, (D) Monozyten, (E) Neutrophilen Granulozyten, (F) Dendritischen Zellen, (G) Makrophagen, (H) CD206<sup>+</sup>, (I) CD206<sup>-</sup> Makrophagen, (J) Klassischen Monozyten, (K) Nichtklassischen Monozyten und (L) Intermediären Monozyten in weiblichen KO und WT Herzen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle. Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=6-9); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test;  $*p<0,05$ .

AngII induzierte in *Gpr55* deletierten Herzen einen Anstieg von Leukozyten, aber nicht in der WT Kontrollgruppe (Abb. 24 B). In keinem der Genotypen kam es zur Einwanderung oder Vermehrung von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten durch die 28-tägige AngII Behandlung (Abb. 24 D-E). Zudem war die Anzahl von dendritischen Zellen und Makrophagen weitestgehend unbeeinflusst von der AngII Infusion und dem Genotyp (Abb. 24 F-I). Die Makrophagen konnten dabei größtenteils als CD206 positiv klassifiziert werden, einem Marker für alternativ aktivierte Makrophagen, die als proreparativ gelten (107). Dagegen waren die CD206 negativen Makrophagen unabhängig von AngII in KO Herzen im Vergleich zu WT Herzen signifikant erhöht, bildeten aber in beiden Genotypen nur einen kleinen Teil der gesamten Makrophagen Population.

In der männlichen Kohorte zeigte sich unabhängig vom Genotyp kein AngII-induzierter Anstieg der kardialen Leukozyten (Tab. 29). Jedoch war die Lymphozytenzahl in KO Herzen behandlungsunabhängig signifikant erhöht im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Die weiteren untersuchten Zellpopulationen blieben unbeeinflusst von Behandlung und Genotyp. Zusammengefasst führte die hier verwendete, moderate, 28-tägige AngII Infusion unabhängig vom Geschlecht in WT Herzen nicht zu einer Vermehrung von Immunzellen und in Abwesenheit von *Gpr55* nur in Weibchen zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl.

**Tab. 29: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Immunzellpopulation in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

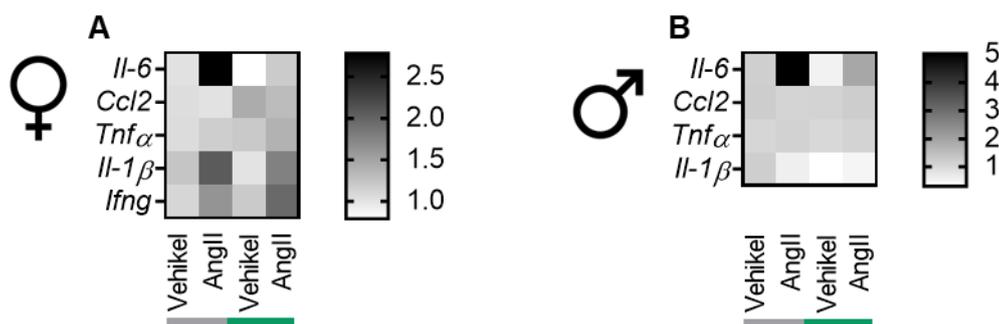
	WT Vehikel (n=5)	KO Vehikel (n=7)	WT AngII (n=5)	KO AngII (n=7)
Leukozyten [Zellen pro mg]	613 ± 77	861 ± 119	702 ± 50	1031 ± 199
Lymphozyten [Zellen pro mg]	83 ± 19	223 ± 40 #	105 ± 19	234 ± 47
Monozyten [Zellen pro mg]	23 ± 3	36 ± 6	30 ± 7	44 ± 11
Klassische Monozyten [Zellen pro mg]	6 ± 1	9 ± 2	6 ± 1	12 ± 3
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro mg]	12 ± 3	19 ± 3	18 ± 5	23 ± 7
Intermediäre Monozyten [Zellen pro mg]	5 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	8 ± 2
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro mg]	33 ± 9	42 ± 14	36 ± 14	32 ± 6
Dendritische Zellen [Zellen pro mg]	5 ± 1	10 ± 2	8 ± 3	19 ± 6

## Ergebnisse

Makrophagen [Zellen pro mg]	289 ± 34	315 ± 45	321 ± 41	328 ± 32
CD206+ Makrophagen [Zellen pro mg]	264 ± 34	272 ± 38	295 ± 41	278 ± 28
CD206- Makrophagen [Zellen pro mg]	25 ± 4	43 ± 8	26 ± 4	50 ± 13

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; #p<0,05 KO vs. WT.

Es ist bekannt, dass AngII eine Freisetzung von IL-6 (Interleukin-6) im Herz induziert (4, 5, 108). Dies konnte in der WT Kontrollgruppe in Weibchen und Männchen durch einen signifikanten Anstieg der kardialen *Il-6* mRNA Expression nach AngII Infusion bestätigt werden (Abb. 25 A-B). Dagegen konnte in den jeweiligen KO Gruppen keine Zunahme der *Il-6* Expression nachgewiesen werden. Ebenfalls geschlechtsunabhängig blieb, passend zum fehlenden Anstieg von Monozyten, nach AngII Infusion die kardiale Expression des chemotaktisch auf Monozyten wirkenden Faktors *Ccl2* (CC-Chemokin-Ligand-2) unverändert zwischen den untersuchten Gruppen. Auch die Expression von *Tnfα* (Tumornekrosefaktor-α) und den weiteren proinflammatorischen Faktoren *Il-1β* (Interleukin-1β) und *Ifng* (Interferon-γ) war geschlechtsunabhängig unbeeinflusst von AngII oder dem Genotyp. Einzig war die *Il-1β* mRNA Expression unter Vehikelbedingungen in männlichen KO Herzen signifikant erniedrigt gegenüber der WT Kontrollgruppe. Zusammengefasst ergab sich in WT Herzen in beiden Geschlechtern das Bild einer milden kardialen Entzündungsreaktion nach AngII Behandlung. Diese spiegelte sich vor allem in einer Heraufregulation von *Il-6* wider, die durch die Deletion von *Gpr55* unabhängig vom Geschlecht inhibiert wurde.



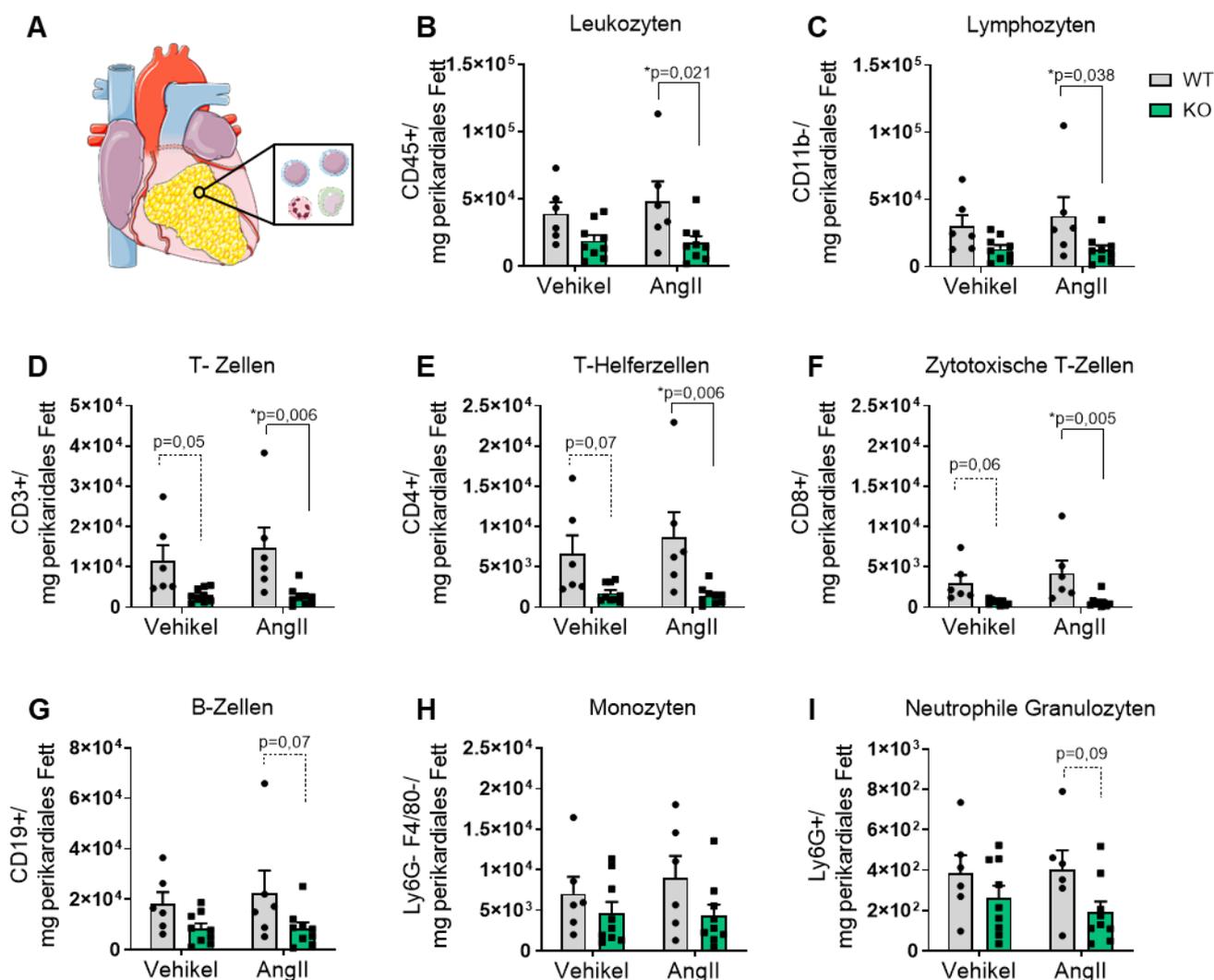
**Abb. 25: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die kardiale Expression proinflammatorischer Faktoren in der AngII-induzierten LV Hypertrophie**

Mittels qPCR quantifizierte kardiale mRNA Expression von (A) *Il-6*, *Ccl2*, *Tnfα*, *Il-1β* und *Ifng* in Weibchen und (B) *Il-6*, *Ccl2*, *Tnfα* und *Il-1β* in Männchen in KO und WT Herzen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle.

(Modifiziert nach Schopohl et al. (105)).

## Ergebnisse

In dem das Herz umgebenden Fettgewebe finden sich Immunzellcluster, die im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen aktiviert werden können (109). Wie Abb. 26 zeigt, fand sich kein Einfluss von AngII auf die Immunzellzahl im perikardialen Fettgewebe in WT Weibchen. Jedoch war nach AngII Behandlung die Gesamtzahl von Leukozyten und Lymphozyten sowie die Zahl der T-Zellen (CD3+) in Abwesenheit von *Gpr55* vermindert gegenüber der WT Kontrollgruppe (Abb. 26 B-D). Die verminderte T-Zellzahl in KO Herzen war dabei sowohl auf eine reduzierte Zahl der CD4+ T-Helferzellen als auch der CD8+ zytotoxischen T-Zellen zurückzuführen (Abb. 26 E-F). Diese Regulation zeigte sich tendenziell (CD3+ T-Zellen:  $p=0,05$ , CD4+ T-Zellen:  $p=0,07$ , CD8+ T-Zellen:  $p=0,06$ ) bereits unter Vehikelbedingungen, erreichte jedoch erst unter AngII Infusion Signifikanz. Nach AngII Infusion zeigte sich derselbe Trend auch für die Zahlen von CD19+ B-Zellen ( $p=0,07$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $p=0,09$ ) im perikardialen Fettgewebe (Abb. 26 G-I).



**Abb. 26: Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die inflammatorische Reaktion im perikardialen Fett in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen**

(A) Schematische Darstellung von Immunzellen im perikardialen Fettgewebe. Mittels Durchflusszytometrie gemessene Anzahl der (B) Leukozyten, (C) Lymphozyten, (D) CD3+, (E) CD4+, (F) CD8+ T-Zellen, (G) B-Zellen, (H) Monozyten und (I) Neutrophilen Granulozyten im perikardialen Fettgewebe von weiblichen KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Behandlung oder Vehikel Infusion als Kontrolle. Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n=6-9$ ); two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; \* $p<0,05$ .

Die Analyse der Immunzellen im perikardialen Fettgewebe in Männchen (Tab. 30) ergab mit der weiblichen Kohorte vergleichbare Ergebnisse. Hier waren die Zellzahlen der Leukozyten und Monozyten in Abwesenheit von *Gpr55* bereits unter Vehikelbedingungen signifikant erniedrigt gegenüber den WT Kontrollen. Der gleiche Trend zeigte sich für CD3+ T-Zellen ( $p=0,08$ ) sowie B-Zellen ( $p=0,05$ ).

Somit führte die moderate AngII Dosis zu keiner messbaren Entzündungsreaktion im perikardialen Fettgewebe in Wildtypen. Jedoch scheint GPR55 unabhängig vom Geschlecht eine Rolle in der Größe der Immunzellcluster im perikardialen Fett zu spielen und die *Gpr55* Deletion zu einer Suppression der hier lokalisierten Immunzellen zu führen. Zusammenfassend ergaben sich Hinweise, dass GPR55 geschlechtsunabhängig mit antiinflammatorischen kardialen Effekten assoziiert ist, die neben einer Inhibition der AngII-induzierten *Il-6* Heraufregulation, auch eine Reduktion proinflammatorischer Zellen im perikardialen Fettgewebe umfasst.

**Tab. 30: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die inflammatorische Reaktion im perikardialen Fett in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

	WT Vehikel (n=5)	KO Vehikel (n=8)	WT AngII (n=6)	KO AngII (n=8)
Leukozyten [Zellen pro mg]	35327 ± 12396	12782 ± 4013 #	24311 ± 6022	7795 ± 2586
Lymphozyten [Zellen pro mg]	22458 ± 7990	8760 ± 2821	14809 ± 3773	5268 ± 1791
Monozyten [Zellen pro mg]	10972 ± 3772	3027 ± 994 #	7730 ± 2042	1782 ± 630 #
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro mg]	654 ± 274	245 ± 71	710 ± 265	151 ± 48 #
T-Zellen (CD3+) [Zellen pro mg]	5667 ± 2086	2627 ± 735	3029 ± 773	977 ± 286
T-Helferzellen (CD4+) [Zellen pro mg]	3210 ± 1209	1528 ± 416	1510 ± 463	525 ± 159
Zytotoxische T-Zellen (CD8+) [Zellen pro mg]	1240 ± 485	549 ± 173	640 ± 176	199 ± 59
B-Zellen (CD19+) [Zellen pro mg]	14326 ± 5515	5220 ± 1707	10411 ± 2707	3030 ± 1116

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; # $p<0,05$  KO vs. WT.

Neben der lokalen Immunreaktion im Herzmuskel und im angrenzenden Fettgewebe wurde auch eine systemische Entzündungsreaktion in Blut, Milz und Knochenmark in Weibchen untersucht (Tab. 31). Hier zeigte sich in Abwesenheit von *Gpr55* behandlungsunabhängig eine

## Ergebnisse

gegenüber der WT Kontrollgruppe nicht signifikant erhöhte Zahl von neutrophilen Granulozyten im Blut ( $p=0,10$ ) und in der Milz ( $p=0,05$ ). Zudem war im Knochenmark *Gpr55* deletierter Mäuse die Zahl der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten nach AngII Infusion signifikant erhöht im Vergleich zu den WT Kontrollen. Dagegen konnte in Blut, Milz und Knochenmark kein Unterschied der Lymphozyten- und Monozytenzahl zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden. Somit konnte genotypunabhängig, korrespondierend mit der kardial nur milde ausgeprägten Entzündungsreaktion, keine systemische Immunzellproliferation oder -migration infolge der AngII Behandlung nachgewiesen werden.

**Tab. 31: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die systemische, inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Weibchen**

Milz	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=9)	WT AngII (n=5)	KO AngII (n=9)
Leukozyten [Zellen pro mg]	226293 ± 31819	241001 ± 33786	294941 ± 45761	223301 ± 31872
Lymphozyten [Zellen pro mg]	203810 ± 27680	204084 ± 29734	265400 ± 44370	186118 ± 29813
Monozyten [Zellen pro mg]	2101 ± 538	2821 ± 570	2298 ± 396	3014 ± 918
Klassische Monozyten [Zellen pro mg]	1305 ± 332	1578 ± 316	1355 ± 243	1592 ± 414
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro mg]	592 ± 71	1239 ± 278	939 ± 164	1419 ± 546
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro mg]	4619 ± 799	12843 ± 3644	7334 ± 1456	13866 ± 1160
Knochenmark	WT Vehikel (n=6)	KO Vehikel (n=9)	WT AngII (n=6)	KO AngII (n=9)
Leukozyten [Zellen pro femur]	2304992 ± 657326	3033507 ± 271219	1952425 ± 330684	3777357 ± 610396 #
Lymphozyten [Zellen pro femur]	296589 ± 117556	530391 ± 57395	311125 ± 91482	621668 ± 162784
Monozyten [Zellen pro femur]	73867 ± 59466	134546 ± 36398	54175 ± 24282	163828 ± 50975
Klassische Monozyten [Zellen pro femur]	65333 ± 52387	113267 ± 29503	47500 ± 21302	142369 ± 44357
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro femur]	8336 ± 6915	20952 ± 7276	6608 ± 2975	20967 ± 7696
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro femur]	1305864 ± 289642	1519628 ± 155235	1060061 ± 170485	2018235 ± 274056 #

## Ergebnisse

Blut	WT Vehikel (n=4)	KO Vehikel (n=9)	WT AngII (n=4)	KO AngII (n=9)
Leukozyten [Zellen pro ml]	1951817 ± 378400	1726630 ± 208887	2354967 ± 434694	2158482 ± 263246
Lymphozyten [Zellen pro ml]	1378350 ± 337244	850207 ± 110598	1287100 ± 195284	1092400 ± 182527
Monozyten [Zellen pro ml]	161550 ± 6755	211941 ± 41624	184367 ± 17377	236555 ± 61601
Klassische Monozyten [Zellen pro ml]	95217 ± 5845	104904 ± 18357	117100 ± 23342	126504 ± 32295
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro ml]	66667 ± 8450	107267 ± 27134	67567 ± 8047	110311 ± 32821
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro ml]	200967 ± 13383	437652 ± 80957	377800 ± 40856	590733 ± 69512

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; #p<0,05 KO vs. WT.

Auch in der männlichen Kohorte hatte die AngII Infusion in WT Tieren keinen wesentlichen Einfluss auf die Immunzellzahlen in Blut, Milz und Knochenmark (Tab. 32). Im Gegensatz zu Weibchen waren die Zahlen der Monozyten und Leukozyten im Blut unter Vehikelbedingungen signifikant niedriger in KO Mäusen im Vergleich zu den WT Kontrollen. Der gleiche Trend zeigte sich für die Anzahl der neutrophilen Granulozyten (p=0,09). In der Milz und im Knochenmark konnte in Männchen dagegen keine evidente Regulation von Genotyp oder Behandlung auf die hier untersuchten Immunzellpopulationen nachgewiesen werden.

Somit induzierte die Abwesenheit von GPR55 per se im Gegensatz zur weiblichen Kohorte nur in Männchen eine Reduktion der Zahl der zirkulierenden myeloiden Zellen. Dagegen konnte bis auf eine Erhöhung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark von AngII behandelten KO Weibchen unabhängig vom Geschlecht keine AngII abhängige Regulation der analysierten Zellpopulationen nachgewiesen werden.

**Tab. 32: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses der *Gpr55* Deletion auf die systemische, inflammatorische Reaktion in der AngII-induzierten LV Hypertrophie in Männchen**

Milz	WT Vehikel (n=4)	KO Vehikel (n=7)	WT AngII (n=5)	KO AngII (n=7)
Leukozyten [Zellen pro mg]	258274 ± 70909	308594 ± 57815	250828 ± 58411	254275 ± 52461
Lymphozyten [Zellen pro mg]	218678 ± 63281	269265 ± 53662	224613 ± 52992	214219 ± 45968
Monozyten [Zellen pro mg]	4364 ± 1038	4214 ± 1472	3136 ± 825	3830 ± 1616

## Ergebnisse

Klassische Monozyten [Zellen pro mg]	2859 ± 748	2298 ± 721	2039 ± 562	2295 ± 970
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro mg]	1504 ± 304	1909 ± 759	1096 ± 268	1529 ± 653
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro mg]	16765 ± 6398	12541 ± 1589	7603 ± 1729	16768 ± 3295
<b>Knochenmark</b>	<b>WT Vehikel (n=5)</b>	<b>KO Vehikel (n=6)</b>	<b>WT Angll (n=6)</b>	<b>KO Angll (n=7)</b>
Leukozyten [Zellen pro femur]	2988013 ± 380836	4223047 ± 286208	4384486 ± 612232	4961236 ± 459745
Lymphozyten [Zellen pro femur]	320460 ± 83139	583920 ± 97941	566239 ± 158716	550576 ± 75029
Monozyten [Zellen pro femur]	101670 ± 40651	66439 ± 15038	120986 ± 26892	121479 ± 35510
Klassische Monozyten [Zellen pro femur]	87774 ± 42044	56903 ± 14016	108403 ± 24181	103945 ± 31623
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro femur]	13803 ± 6434	9453 ± 1263	12433 ± 3291	17414 ± 4410
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro femur]	1683410 ± 304741	2479186 ± 180446	2355917 ± 323154	3032995 ± 276638
<b>Blut</b>	<b>WT Vehikel (n=5)</b>	<b>KO Vehikel (n=7)</b>	<b>WT Angll (n=6)</b>	<b>KO Angll (n=7)</b>
Leukozyten [Zellen pro ml]	3021227 ± 442333	1901924 ± 288546 #	2546833 ± 325378	2415409 ± 205269
Lymphozyten [Zellen pro ml]	1448760 ± 390196	994838 ± 140571	1551078 ± 294635	1063219 ± 85317
Monozyten [Zellen pro ml]	315427 ± 44117	138610 ± 23632 #	238022 ± 31067	258028 ± 46534
Klassische Monozyten [Zellen pro ml]	223374 ± 35524	76381 ± 16724 #	165789 ± 22223	145695 ± 26747
Nichtklassische Monozyten [Zellen pro ml]	92480 ± 20900	62590 ± 8519	72444 ± 11664	112857 ± 23621
Neutrophile Granulozyten [Zellen pro ml]	1034733 ± 264362	543838 ± 136937	567056 ± 99861	850572 ± 133075

Darstellung der Daten als Mittelwert ± SEM; two-way ANOVA mit Šidák Post-hoc-Test; #p<0,05 KO vs. WT.

## 6. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Rezeptors GPR55 in der pathologischen druckinduzierten Hypertrophie zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere ein Einfluss von GPR55 auf das strukturelle und funktionelle Remodeling und auf die diesem zugrunde liegenden maladaptiven Modifikationen prohypertropher Signaltransduktion, metabolischer Faktoren und inflammatorischer Antworten aufgedeckt werden. Hierfür wurden die genannten Aspekte in *Gpr55* KO und WT Mäusen nach 28-tägiger AngII Infusion im Vergleich zu Vehikel infundierten Kontrollen analysiert.

### 6.1 Die *Gpr55* Deletion induziert basal eine diastolische LV-Dilatation in Weibchen

Um eine Auswirkung von GPR55 auf das druckbelastete Herz besser einschätzen zu können, ist es zunächst notwendig, den basalen kardialen Phänotyp in Abwesenheit von *Gpr55* näher zu charakterisieren. Die *Gpr55* Deletion per se war in Weibchen mit einer Zunahme des Herzgewichts assoziiert. Dies war nicht auf eine basale Verdickung der linksventrikulären Wände in KO Herzen, sondern am ehesten auf eine Vergrößerung der enddiastolischen Kavität, als Hinweis auf eine kardiale Volumenbelastung, zurückzuführen. Dieser basale Phänotyp *Gpr55* defizienter Mäuse wurde bereits von Puhl et al. berichtet. Aufgrund fehlender Hinweise für eine systemische Volumenüberladung in Abwesenheit von *Gpr55*, jedoch einer erhöhten diastolischen Sarkomerlänge in KO Kardiomyozyten führte die Studie als mögliche Ursachen für das vergrößerte enddiastolische Volumen eine veränderte diastolische Vordehnung oder Füllungsdynamik an (101). Damit übereinstimmend konnte in der hier vorliegenden Arbeit in Abwesenheit von *Gpr55* kein Flüssigkeitsrückstau in die Lunge oder die Leber, als Anzeichen einer erhöhten kardialen Vorlast, nachgewiesen werden. Passend zu den basalen kardialen Strukturveränderungen in KO Weibchen konnte eine Heraufregulation von p38 in derselben Kohorte beobachtet werden. Diese könnte auf einer gesteigerten diastolischen Vordehnung der KO Kardiomyozyten beruhen. So wurde bereits gezeigt, dass eine mechanische Stimulation *in vitro* eine kardiale Aktivierung dieser MAP-Kinase induzieren kann (110, 111).

Im Gegensatz zur weiblichen Kohorte beeinflusste die *Gpr55* Deletion per se die Ausprägung oben genannter, morphologischer Parameter in männlichen KO Herzen nicht. Dies deutet auf einen geschlechtsabhängigen regulatorischen Einfluss von GPR55 auf die kardiale Ventrikelgeometrie hin. Die nur in KO Weibchen beobachtete diastolische LV Volumenvergrößerung könnte auf eine mögliche geschlechtsabhängige Rolle von GPR55 in der Regulation der diastolischen Füllung und Lusitropie hinweisen. Geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der diastolischen Funktion sind klinisch vor allem im Zusammenhang mit einem häufigeren

Auftreten einer diastolischen Dysfunktion bei weiblichen Patienten beschrieben (9). Diesbezüglich könnte GPR55 vor allem in Frauen ein therapeutisches Ziel darstellen. Eine mögliche pathophysiologische Rolle von GPR55 wurde in diesem Zusammenhang bisher noch nicht näher untersucht und sollte in Zukunft weiter evaluiert werden.

## **6.2 Die *Gpr55* Deletion hat keinen Einfluss auf das AngII-induzierte strukturelle Remodeling**

Zur näheren Charakterisierung einer Rolle von GPR55 in der hypertensiven Herzerkrankung wurde das strukturelle Remodeling nach 28-tägiger AngII Infusion in KO und WT Herzen analysiert. AngII induzierte in WT Herzen eine moderat konzentrische Hypertrophie, vergleichbar mit bisher publizierten Daten zur AngII-induzierten Hypertrophie im Mausmodell (112-115). Als Zeichen einer RAAS Aktivierung stieg zudem die AT1R Proteinexpression infolge der AngII Infusion in WT Weibchen an. Eine Steigerung der kardialen AT1R Expression im Rahmen der Kardiomyozytenhypertrophie konnte bereits mehrfach in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden und kann zur Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie beitragen (116-118).

Das weibliche Geschlecht ist im Zuge des hypertensiven Remodelings mit einer stärkeren Ausprägung einer konzentrischen Hypertrophie assoziiert (119, 120). Dementsprechend war die strukturelle Hypertrophie in WT Weibchen stärker ausgeprägt im Vergleich zu WT Männchen. Unabhängig vom Geschlecht beeinflusste die *Gpr55* Deletion das Ausmaß des AngII-induzierten strukturellen Remodelings weder in der gravimetrischen noch in der histologischen oder echokardiographischen Untersuchung. In Übereinstimmung damit ergab sich auch in einer Studie von Pedzinska-Betiuk et al. nach einer 10-tägigen Infusion mit dem GPR55 Antagonisten Cannabidiol kein Einfluss auf den Anstieg des Herzgewichts männlicher Ratten in zwei verschiedenen Modellen der hypertensiven Herzerkrankung (121).

## **6.3 Die *Gpr55* Deletion moduliert die hypertrophe Signaltransduktion**

Trotz des fehlenden Einflusses der *Gpr55* Deletion auf das AngII-induzierte strukturelle Remodeling zeigte sich eine distinkte Regulation der prohypertrophen Signaltransduktion. Diese umfasst die Expression wichtiger kardiomyozytärer, prohypertropher Transkriptionsfaktoren sowie die Aktivität der diesen vorgeschalteten Proteinkinasen. Hierbei konnte insbesondere eine Rolle von GPR55 als Regulator der fetalen Genexpression in der AngII-induzierten Hypertrophie aufgedeckt werden.

### **6.3.1 Die *Gpr55* Deletion supprimiert die Reexpression fetaler Gene in der AngII-induzierten Hypertrophie**

In Abwesenheit von *Gpr55* kam es unabhängig vom Geschlecht zur Inhibition der Reaktivierung des fetalen Genprogramms. Eine Suppression der etablierten Hypertrophiemarker in

*Gpr55* defizienten Mäusen konnte zuvor auch im Rahmen des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt gezeigt werden und scheint daher weitgehend unabhängig vom auslösenden kardiovaskulären Ereignis zu sein (101). Es wurde bereits berichtet, dass der Cannabinoidligand Anandamid die Endothelin-1 induzierte BNP Expression in neonatalen Kardiomyozyten hemmen kann. Aufgrund der Aufhebung dieses Effekts durch den CB1-Rezeptor Antagonisten AM251 führten die Autoren dies auf eine Aktivierung des CB1-Rezeptors zurück, konnten aber eine Beteiligung von GPR55, an dem AM251 agonistisch wirkt, nicht ausschließen (122). Darüber hinaus führte die Stimulation mit dem CB1-Rezeptor Antagonisten Rimonabant zu einer Verstärkung der ANP Sekretion infolge einer akuten extrazellulären Volumenbelastung in Ratten (123). GPR55 könnte auch einen möglichen Vermittler dieses Effekts darstellen. So wurde beschrieben, dass durch Rimonabant *in vitro* neben einer Hemmung des CB1-Rezeptors auch eine Aktivierung von GPR55 bewirken kann (72, 77). Zu den Regulatoren des fetalen Genprogramms zählen die Transkriptionsfaktoren MEF2C und GATA4 (24). Eine veränderte Expression letzterer als Ursache für die Suppression der AngII-induzierten Reexpression der fetalen Gene in Abwesenheit von *Gpr55* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Eine fehlende Reaktivierung der fetalen Gene ist mit einer besseren Prognose und geringeren Ausprägung maladaptiver Prozesse im Rahmen des pathologischen Remodelings assoziiert. Jedoch spielt die Reexpression des fetalen Genprogramms auch eine wichtige Rolle in der Kompensation an eine Druckbelastung (4, 11, 24). Dies wird durch den Erfolg der neuen, in der Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzten, Kombinationstherapie eines AT1R Antagonisten mit einem Natriuretik Inhibitor, die den Spiegel der natriuretischen Peptide steigert, unterstrichen (124). Mögliche negative Folgen einer fehlenden kompensatorischen Wirkung der fetalen Gene in Abwesenheit von *Gpr55* sollten daher vor allem im Rahmen fortgeschrittener kardiovaskulärer Erkrankungen, wie einer manifesten Herzinsuffizienz, weiter untersucht werden.

### **6.3.2 Die *Gpr55* Deletion hat keinen Einfluss auf die AT1R vermittelte Signaltransduktion durch MAP-Kinasen**

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der Reaktivierung der fetalen Gene in KO Herzen auf einer verminderten Aktivierung der vorgeschalteten Signaltransduktion beruht, wurde anschließend eine Expressionsanalyse des AT1R und der MAP-Kinasen durchgeführt. Diese ergab keinen Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die AT1R mRNA- oder Proteinexpression in weiblichen Herzen. In Männchen dagegen bewirkte die *Gpr55* Deletion einen behandlungsunabhängigen Anstieg der *Agtr1* mRNA Expression. Die geschlechtsunabhängige Suppression der fetalen Genexpression in Abwesenheit von *Gpr55* spricht jedoch gegen eine erhöhte AT1R Aktivität

männlicher KO Herzen und ist damit unabhängig vom Geschlecht nicht auf eine veränderte AT1R Expression zurückzuführen.

Weiterhin konnte unabhängig vom Genotyp in weiblichen Herzen kein Effekt auf die Aktivierung der MAP-Kinasen infolge der AngII Infusion nachgewiesen werden. Dies ist am ehesten durch das hier untersuchte moderate Stadium der Hypertrophie bedingt. So wurde bezüglich der AngII-induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen eine Zeit- und Dosisabhängigkeit bzw. eine distinkte Regulation je nach verwendetem Hypertrophie Modell bereits gezeigt (125, 126). Darüber hinaus scheint eine Aktivierung von ERK und p38 $\alpha$  im Mausmodell für die Induktion einer Hypertrophie nicht erforderlich zu sein (11, 127). Daher spielt eine Aktivierung der MAP-Kinasen in dem hier untersuchten Stadium der Hypertrophie möglicherweise eine eher geringe Rolle und unterlag zudem keiner Regulation durch die *Gpr55* Deletion.

### **6.3.3 Die *Gpr55* Deletion induziert eine adaptive Signaltransduktion durch AKT in der AngII-induzierten Hypertrophie**

Die *Gpr55* Deletion beeinflusste das AngII-induzierte Remodeling folglich nicht durch eine Modulation der Signaltransduktion durch MAP-Kinasen, führte aber zu einer, im Vergleich zu den WT Kontrollen, signifikant gesteigerten Aktivierung von AKT. Für einen regulatorischen Einfluss von GPR55 auf die kardiale Phosphorylierung von AKT spricht zudem die Beobachtung von Rajesh et al., dass eine Behandlung mit dem GPR55 Antagonist Cannabidiol eine verminderte Aktivierung von AKT im Rahmen der murinen, diabetischen Kardiomyopathie aufhebt und zugleich den Grad der kardialen Dysfunktion und Fibrose vermindert (128). Im Rahmen der pathologischen Hypertrophie kann pAKT sowohl adaptive als auch maladaptive Funktionen ausüben. Jedoch war die Proteinexpression der p110 $\gamma$  Untereinheit der PI3K, die pAKT infolge eines pathologischen Stimulus aktiviert, unabhängig vom Genotyp durch die AngII Infusion nicht erhöht. Die adaptive Signaltransduktion durch AKT im Rahmen der physiologischen Hypertrophie wird dagegen durch den IGF-1R-PI3Kp110 $\alpha$  Signalweg getriggert (22).

In der vorliegenden Untersuchung ergab sich auch kein Effekt der *Gpr55* Deletion auf die Proteinexpression des IGF-1R oder der p110 $\alpha$  Untereinheit der PI3K. Trotzdem deutet die hier im Vergleich zur WT Kontrollgruppe nur leichte, etwa 3-fache Erhöhung des pAKT/AKT Verhältnisses in AngII behandelten KO-Herzen eher auf ein Überwiegen der adaptiven Funktionen der Proteinkinase hin. So legen *in vivo* Daten nahe, dass eine moderate Aktivierung von AKT eher protektiv wirken könnte, während eine massive Heraufregulation zur Maladaptation führt (5). Darüber hinaus könnte ein verstärktes adaptives pAKT Signalling in Abwesenheit von *Gpr55* dazu beitragen, dass, vergleichbar mit dem Phänotyp einer physiologischen Hypertrophie (11, 22), die Reexpression der fetalen Gene im Rahmen der AngII-induzierten Hypertrophie supprimiert wird.

## 6.4 Die *Gpr55* Deletion moduliert die kardiale Funktion

Als nächstes wurde eine Analyse der kardialen Funktion vorgenommen, um zu evaluieren, ob die Hemmung der maladaptiven Genexpression in Abwesenheit von *Gpr55* mit einer verbesserten Kontraktilität korreliert.

### 6.4.1 Die *Gpr55* Deletion steigert die Inotropie infolge der AngII Infusion

Passend zu dem Stadium der konzentrischen Hypertrophie und der milden Aktivierung der prohypertrophen Signaltransduktion zeigten die WT Kontrollen in der hier vorliegenden Studie eine kompensierte, erhaltene kardiale Funktion. Dem Phänotyp einer physiologischen Hypertrophie ähnelnd erfolgte in KO Herzen unabhängig vom Geschlecht nach AngII Infusion ein Anstieg der Inotropie. Dies wurde von einer im Vergleich zu WT Herzen vor allem systolisch stärker ausgeprägten Verkleinerung der linksventrikulären Kavitäten reflektiert. Es wurde bereits anhand von *in vivo* Studien sowie *in vitro* Untersuchungen an humanem Herzmuskel berichtet, dass AngII neben einer, in fortgeschrittenen Stadien des pathologischen Remodelings auftretenden, kardialen Dysfunktion auch direkte positiv inotrope Effekte auf die kardiale Funktion ausüben kann (129, 130). In Abwesenheit von *Gpr55* scheinen nicht nur maladaptive Mechanismen infolge der AngII Infusion unterdrückt zu werden, sondern auch die positiv inotrope Wirkung in den Vordergrund zu treten. Zudem wurde eine direkte Beeinflussung der Kalziumsensitivität der Myofilamente in *Gpr55* defizienten Kardiomyozyten bereits beobachtet und könnte synergistisch zu den positiv inotropen Effekten von AngII wirken (101).

Erst kürzlich wurde berichtet, dass eine Aktivierung des CB1-Rezeptors durch Cannabinoidliganden in die AngII vermittelte funktionelle Reaktion isolierter Rattenherzen involviert ist. Dabei kam es nach Hemmung des CB1-Rezeptors zu einer Abnahme einer akut negativ lusitropen und inotropen Wirkung infolge einer AngII Behandlung (131). Eine *in vitro* Studie zeigte weiterhin, dass CB1-Rezeptoren mit GPR55 in HEK-Zellen Heterodimere formen und auf diese Weise eine CB1-Rezeptor Inaktivierung auch die Signaltransduktion durch GPR55 hemmen kann (132). Eine derartige Interaktion beider Rezeptoren könnte auch in Kardiomyozyten eine Modulation der kardialen Kontraktilität auslösen.

### 6.4.2 Die *Gpr55* Deletion vermindert behandlungsunabhängig die Chronotropie

Die konstant erhöhte Herzfrequenz ist ein Risikomarker für die Gesamtsterblichkeit, im Speziellen auch für die Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen. Dementsprechend senkt eine negativ chronotrope Therapie mit Ivabradin die Mortalität und Morbidität der Herzinsuffizienz (133). Die *Gpr55* Deletion führte in der vorliegenden Arbeit unabhängig vom Geschlecht und von der AngII Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Herzfrequenz. Puhl et al. beschrieben bereits eine Bradykardie in *Gpr55* defizienten Mäusen und zeigten weiterhin, dass

diese nicht auf eine Isofluran Narkose während der Messung zurückgeführt werden kann, sondern auch unabhängig davon auftritt (101). Im Gegensatz dazu konnten Walsh et al. während einer invasiven Messung unter einer Ketamin/Xylazin Narkose eine erhöhte basale Herzfrequenz in *Gpr55* KO Mäusen detektieren (90). Widersprüchliche Ergebnisse resultierten in diesem Zusammenhang auch nach Behandlung mit dem *Gpr55* Antagonisten Cannabidiol. Während die meisten tierexperimentellen sowie humanen Studien keinen Einfluss durch Cannabidiol auf die Herzfrequenz zeigten, konnten einzelne Untersuchungen sowohl negative als auch positiv chronotrope Effekte nachweisen (134, 135).

#### **6.4.3 Die *Gpr55* Deletion führt zum Erhalt der inotropen und chronotropen Reserve nach der AngII Infusion**

Aufgrund der negativen Chronotropie und AngII-induzierten positiven Inotropie in Abwesenheit von *Gpr55* sollte anschließend überprüft werden, ob diese Effekte auf einer Modulation des sympathischen Systems beruhen. Dabei zeigte sich, dass die *Gpr55* Deletion in Weibchen eine AngII abhängige Herabregulation und demnach potenziell eine Desensibilisierung von  $\beta$ 1-Adrenozeptoren verhindert. In Männchen deutete sich dagegen sogar ein behandlungsunabhängiger Anstieg der  $\beta$ 1-Adrenozeptor Expression in Abwesenheit von *Gpr55* an. In Zusammenschau mit der erhöhten *Agtr1* Expression in männlichen KO-Herzen deutet dies auf eine geschlechtsabhängige Rolle von GPR55 in der Regulation der Expression neurohumoraler Rezeptoren hin. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen führte die chronische Behandlung mit dem GPR55 Antagonisten Cannabidiol in Ratten zu einer Abnahme der kardialen  $\beta$ 1-Adrenozeptor Expression in normotensiven Kontrollen (121). Ursächlich könnten GPR55 unabhängige Effekte von Cannabidiol, andere modell- und speziesabhängige Faktoren oder auch die Aktivierung gegenregulatorischer Mechanismen sein.

Im Dobutamin Stresstest in der weiblichen Kohorte zeigte sich in Abwesenheit von *Gpr55* ein Erhalt der chronotropen und inotropen Reserve nach AngII Infusion. Diesem Ergebnis widersprach die bereits unter 6.4.2 zitierte Studie von Walsh et al., die von einer Reduktion der  $\beta$ -adrenergen positiv inotropen Effekte in jungen und alten *Gpr55* KO Mäusen berichtete (90). Dabei bezogen sich die Beobachtungen von Walsh *et al.* jedoch auf eine gemischte Kohorte aus weiblichen und männlichen Tieren. Demnach könnten geschlechtsabhängige funktionelle Unterschiede nach *Gpr55* Deletion die Diskrepanz der Untersuchungen erklären. Die divergierenden Ergebnisse könnten darüber hinaus auf der, von der in dieser Arbeit angewandten nicht-invasiven Messung abweichenden, invasiven Messung der kardialen Funktionsparameter beruhen, aber auch durch eine zentrale Modulation der sympathischen Reaktion auf die Ketamin/Xylazin Narkose in der Studie von Walsh und Kollegen infolge der *Gpr55* Deletion bedingt sein (90). So gibt es, basierend auf *in vivo* Studien, Hinweise, dass zentrale Wechselwirkungen des Cannabinoidsystems mit noradrenergen Neuronen bestehen. In diese sind

auch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Gamma-aminobutyric acid (GABA)-Rezeptoren, an denen Ketamin beziehungsweise Isofluran wirken, involviert (136, 137). Die in der hier vorliegenden Studie beobachtete fehlende Desensibilisierung der kardialen  $\beta$ 1-Adrenozeptoren spricht aber für einen direkten kardialen Einfluss der *Gpr55* Deletion, der auch zur erhöhten Inotropie der AngII behandelten KO Herzen beitragen könnte.

In einer weiteren Studie von Walsh et al. beschrieben die Autoren, dass *Gpr55* KO Mäuse eine gesteigerte, positiv inotrope Reaktion auf eine akute Stimulation mit einem  $\alpha$ 1-Agonisten zeigen (91). Die primäre Funktion von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren ist jedoch eine Regulation des Gefäßtonus. Diesbezüglich war die, durch eine  $\alpha$ 1-Adrenozeptor Stimulation ausgelöste, Vasokonstriktion in isolierten Arterien aus KO Mäusen verstärkt, während eine pharmakologische GPR55 Blockade dieser entgegenwirkte (91). Weiterhin konnte in despinalisierten und dezerebrierten Ratten (pithed rats) ein inhibitorischer Effekt des GPR55 Agonisten LPI auf die Noradrenalin vermittelte Vasokonstriktion, in Form einer schwächer ausgeprägten Zunahme des diastolischen Blutdrucks, beobachtet werden (138). Zudem bewirkte die akute Gabe des GPR55 Antagonisten Cannabidiol in despinalisierten und dezerebrierten Ratten (pithed rats) einen Anstieg des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz. Diese sympathomimetische Reaktion konnte jedoch in narkotisierten oder wachen Tieren nicht nachgewiesen werden, hinweisend auf eine Gegenregulation durch das zentrale Nervensystem (135).

Zusammenfassend deutet dies auf eine regulatorische Rolle von GPR55 im sympathischen System hin. Dabei scheinen direkte kardiale und vaskuläre Reaktionen mit einem möglichen zentralen Einfluss von GPR55 zu interagieren. Auf diese Weise könnte eine periphere Blockade von GPR55 sympathomimetische und somit positiv inotrope und vasopressorische Wirkungen vermitteln, die durch eine zentrale GPR55 Antagonisierung abgeschwächt werden. Eine nähere Charakterisierung dieser Effekte, beispielsweise durch den Einsatz einer Kardiomyozyten-spezifischen *Gpr55* Deletion, sollte in weiteren Untersuchungen erfolgen.

## 6.5 Die *Gpr55* Deletion moduliert die $\text{Ca}^{2+}$ abhängige Signaltransduktion

Die positiv inotrope Wirkung von Katecholaminen wird durch einen Anstieg der Kalziumkonzentration im Kardiomyozyten vermittelt. Da  $\text{Ca}^{2+}$  ein wichtiger Regulator prohypertropher Signalwege ist (33), wurde der Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Signaltransduktion in der AngII-induzierten Hypertrophie untersucht. Dabei konnte basal eine erhöhte Proteinexpression von Calmodulin in weiblichen KO Herzen beobachtet werden. Dies könnte auf einer Zunahme der Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten in *Gpr55* defizienten Kardiomyozyten beruhen (101). Diese resultierte jedoch weder in einer erhöhten Aktivität des Calmodulin/Calcineurin Signalwegs noch in einer erhöhten Expression der nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren *Nfatc3* und *Nfatc4* infolge der AngII Behandlung.

Dagegen bewirkte AngII nur in Abwesenheit von *Gpr55* einen Anstieg der Proteinexpression der CaMKII. Dieser könnte auf eine verbesserte Ansprechbarkeit auf Katecholamine oder eine Veränderung der kardiomyozytären Kalziumkonzentration zurückzuführen sein. So konnte eine erhöhte systolische Kalziumkonzentration in isolierten *Gpr55* KO Kardiomyozyten bereits gezeigt werden (101).

Eine Aktivierung der CaMKII kann durch die Induktion des Kardiomyozytenwachstums, die Aktivierung prohypertropher Genexpression und eine proinflammatorische Wirkung zur Entwicklung einer kardialen Dysfunktion beitragen (5, 33). Da es in KO Herzen jedoch nicht zu einer Zunahme des AngII abhängigen strukturellen Remodelings, im Gegensatz aber zu einer Inhibition der Expression fetaler Gene kam, scheint die der CaMKII nachgeschaltete maladaptive Signaltransduktion in Abwesenheit von *Gpr55* supprimiert zu sein. Die Aktivierung der CaMKII könnte sogar vielmehr durch eine Modulation des  $Ca^{2+}$  Handlings die verbesserte Kontraktilität in AngII behandelten KO Herzen begünstigen. So wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung der CaMKII eine essenzielle Rolle in der akuten Anpassung an einen hypertrophen Stimulus spielt (139). Zudem gibt es Hinweise, dass eine CaMKII Aktivierung zur Verbesserung der Kalziumsensitivität von Myofilamenten im Rahmen von Intervalltraining beitragen kann (140).

Abschließend ist der Einfluss der *Gpr55* Deletion sowohl auf die basale als auch auf die AngII-induzierte  $Ca^{2+}$  abhängige Signaltransduktion zudem ein Hinweis auf eine regulatorische Rolle von GPR55 in der kardialen Kalziumhomöostase.

## 6.6 Die *Gpr55* Deletion moduliert Signalwege der kardialen Substrataufnahme

Positiv inotrope Substanzen können zwar kurzfristig hämodynamische Parameter stabilisieren, führen aber in der Behandlung einer chronischen Herzinsuffizienz nicht zu einer Verbesserung später Endpunkte, wie Morbidität und Mortalität. Dies wird unter anderem durch einen Anstieg des kardialen Energiebedarfs durch die genannten Wirkstoffe erklärt (141, 142). Hinzu kommen Veränderungen des kardialen Metabolismus im Rahmen des pathologischen Remodelings, die ein Energiedefizit auslösen können (3, 4). Daher wurde in weiblichen Mäusen analysiert, ob die *Gpr55* Deletion einen Einfluss auf das metabolische Remodeling nimmt, um den AngII-induzierten Anstieg der Inotropie in KO Herzen aufrechtzuerhalten.

Die pathologische Hypertrophie ist durch eine Abnahme des Lipid- und eine Zunahme des Kohlenhydratstoffwechsels, vor allem der anaeroben Glykolyse, gekennzeichnet (3, 36). In der WT Kontrollgruppe konnte infolge der AngII Behandlung keine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors *Ppargc1a*, der die Fettsäureoxidation forciert (36), oder der untersuchten sarkolemmalen und mitochondrialen Transportproteine des Lipidstoffwechsels beobachtet werden. Dies stimmt mit *in vivo* Daten aus Ratten überein, dass eine Abnahme der Fettsäureoxidation erst bei Eintritt einer kardialen Dysfunktion, jedoch noch nicht in kompensierten

Stadien der Hypertrophie stattfindet (143, 144). In Abwesenheit von *Gpr55* war dagegen die mRNA Expression von *Cd36* und *Ppargc1a* sowie die Proteinexpression von GLUT4 behandlungsunabhängig erhöht und deutet damit eine erhöhte Fettsäureoxidation, bei zugleich erhöhter Glukoseaufnahme, an. PGC1 $\alpha$  ist zudem ein Regulator der mitochondrialen Biogenese. Dessen erhöhte Expression in Abwesenheit von GPR55 weist auf eine verbesserte Kapazität der oxidativen Phosphorylierung hin und könnte im Rahmen einer kardiovaskulären Belastung protektiv wirken. So wurde in *Pgc1a* KO Mäusen bereits eine veränderte myokardiale, mitochondriale Genexpression mit verminderter mitochondrialer Enzymaktivität und einer Beeinträchtigung der Kontraktilität isolierter Herzen demonstriert (145). Damit konsistent war die Behandlung einer Doxorubicin induzierten Kardiomyopathie mit dem GPR55 Antagonisten Cannabidiol im Mausmodell mit einer Reduktion des oxidativen Stresses und einer verbesserten mitochondrialen Funktion assoziiert (146). *In vivo* Daten deuten darüber hinaus daraufhin, dass eine Förderung der oxidativen Phosphorylierung durch eine fettreiche und kohlenhydratarme Diät der Reexpression fetaler Gene im Bluthochdruckmodell vorbeugen könnte (147). Der vorgeschlagene Mechanismus beruht auf Glukosemetaboliten, die infolge des Überwiegens der anaeroben Glykolyse vermehrt anfallen und durch Glykosylierung von Transkriptionsfaktoren die kardiale Genexpression beeinflussen (147, 148).

Eine Modulation des kardialen Metabolismus, inklusive der Induktion von PGC1 $\alpha$  und GLUT4, wurde bereits mehrfach *in vitro* und *in vivo* durch die AMPK beschrieben und könnte vor der Transition zur Herzinsuffizienz schützen (38). Jedoch konnte in Abwesenheit von *Gpr55* keine vermehrte Phosphorylierung der AMPK beobachtet werden. Vielmehr deutet die Erhöhung der Proteinexpression des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4 auf eine verstärkte Insulin-abhängige Signaltransduktion in KO Herzen hin. Dies könnte auch die basal erhöhte Expression der p110 $\alpha$  Untereinheit der PI3K erklären, da diese neben dem IGF-1R auch über den Insulinrezeptor aktiviert werden kann (22). Es wurde bereits beschrieben, dass die *Gpr55* Deletion die Insulinsensitivität peripherer Organe beeinflusst. So konnte in Untersuchungen an *Gpr55* defizienten Mäusen nicht nur ein tendenziell erhöhter basaler Insulinspiegel, sondern auch eine erhöhte Insulinresistenz von Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel festgestellt werden (94, 106). Eine Verstärkung der Insulinabhängigen Signaltransduktion in KO Herzen könnte daher entweder auf einen direkten kardialen Effekt des Rezeptors oder auf einen, durch eine Insulinresistenz extrakardialer Organe getriggerten, erhöhten Insulinspiegel bei erhaltener kardialer Insulinsensitivität zurückgeführt werden. Lipina et al. zeigten in KO Mäusen zudem erhöhte Nüchternblutzuckerspiegel und eine stärkere Gewichtszunahme ab einem Alter von 10 Wochen (106). Dabei divergieren jedoch die Ergebnisse verschiedener Studien hinsichtlich der Regulation von Blutzucker und Körpergewicht. So fanden Wargent et al. keinen Einfluss der *Gpr55* Deletion im Mausmodell auf Insulinsensitivität, Körpergewicht oder Energiebilanz, jedoch eine verminderte Glukosetoleranz nach Ernährung mittels fettreicher Diät

(149). In Übereinstimmung damit blieben der Blutzucker und das Körpergewicht in der vorliegenden Studie unbeeinflusst von der *Gpr55* Deletion.

Während Insulin die kardiale Glukoseverbrennung fördert, führt es zu einer Abnahme der Fettsäureoxidation (40). Daher sind zusätzliche Insulin-unabhängige Effekte durch GPR55 auf den kardialen Metabolismus wahrscheinlich. Diesen könnte die erhöhte diastolische Vordehnung der KO Herzen zugrunde liegen. So wurde *in vitro* bereits ein Anstieg der PGC1 $\alpha$  Expression durch eine Dehnung von Kardiomyozyten beobachtet (150).

Zusammengefasst legen diese Beobachtung nahe, dass die *Gpr55* Deletion per se einen Einfluss auf den kardialen Metabolismus ausübt, der sich durch eine verbesserte Energiebereitstellung günstig auf das pathologische Remodeling auswirken könnte. Mögliche Interaktionen mit systemischen Veränderungen des Stoffwechsels und mögliche adverse Effekte einer systemischen Insulinresistenz sollten jedoch beim Einsatz GPR55 inhibierender Wirkstoffe berücksichtigt werden.

### **6.7 Die *Gpr55* Deletion führt zur Reduktion maladaptiver profibrotischer und proinflammatorischer Genexpression in der AngII-induzierten Hypertrophie**

Neben metabolischen Veränderungen kommt es im Rahmen des druckinduzierten pathologischen Remodelings zu proinflammatorischen und profibrotischen Prozessen im Myokard, die im Verlauf eine kardiale Dysfunktion begünstigen (3). In dem hier untersuchten Stadium einer kompensatorischen Hypertrophie konnte jedoch histologisch unabhängig vom Genotyp keine manifeste myokardiale Fibrose nachgewiesen werden. Die 28-tägige AngII Infusion resultierte in den WT Kontrollen nur in einer leichten Heraufregulation kardialer, proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren. Dies könnte auf den, nach 28-tägiger AngII Infusion, eher späten Analysezeitpunkt zurückzuführen sein. So zeigten verschiedene *in vivo* Studien im Herz eine frühe Induktion proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren infolge einer Druckbelastung, die sich im Verlauf zurückbildete (151-153). Eine geschlechtsunabhängige Erhöhung von *Ctgf* in AngII behandelten WT-Herzen wurde durch die *Gpr55* Deletion unterdrückt. Dies könnte sich protektiv auf die kardiale Funktion auswirken. So war in präklinischen Studien eine Inhibition von CTGF in verschiedenen kardialen Stressmodellen mit einer verminderten kardialen Dysfunktion assoziiert (46, 47, 154). Die gleiche Regulation konnte zudem für die AngII abhängige kardiale Expression von *Il-6* gezeigt werden. Eine *Il-6* Defizienz schützt vor dem AngII-induzierten pathologischen Remodeling und der Ausbildung einer kardialen Fibrose (108, 155). Daher könnte die Inhibition der AngII-induzierten *Il-6* Transkription in *Gpr55* defizienten Herzen zur Suppression der profibrotischen Genexpression führen und so der Entstehung einer myokardialen Fibrose vorbeugen. Ein Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die proinflammatorische Genexpression wurde bereits im Rahmen des postischämischen Remodelings

im Mausmodell nachgewiesen. Hierin führte die Abwesenheit von *Gpr55* zu einer verspäteten Zytokinausschüttung (101). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die inflammatorische Reaktion auf AngII in *Gpr55* defizienten Herzen einer veränderten Kinetik unterliegt. Jedoch spricht die Suppression der proinflammatorischen Genexpression in KO Herzen zu dem eher späten Zeitpunkt von 28 Tagen, trotz des chronischen Stimulus der kontinuierlichen AngII Infusion, eher für einen anhaltenden antiinflammatorischen Effekt der *Gpr55* Deletion in diesem Krankheitsmodell. Dabei beeinflusste die AngII Infusion die Zahl der Immunzellen im Myokard unabhängig vom Genotyp und Geschlecht nicht, mit Ausnahme einer leichten AngII-induzierten Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl in Abwesenheit von *Gpr55* in Weibchen. Diese ließ sich größtenteils zurückzuführen auf eine im Vergleich zur WT Kontrollgruppe erhöhte Zahl an Lymphozyten nach AngII Behandlung. Das somit überwiegend Genotyp unabhängige Fehlen einer Immunzellreaktion auf AngII ist ebenfalls am ehesten durch die lange Dauer der AngII Infusion bedingt. So wurde anhand von Mausmodellen mehrfach demonstriert, dass es bereits in frühen Stadien einer Druckbelastung zur kardialen Infiltration und Expansion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen kommt, die zu späteren Zeitpunkten abklingt (153, 156-158). Dazu passend konnte weder im perikardialen Fettgewebe noch systemisch eine AngII abhängige Immunzellexpansion beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigte sich im Rahmen der milden Immunreaktion und profibrotischen Genexpression infolge der 28-tägigen AngII Infusion ein antiinflammatorischer und antifibrotischer Effekt der *Gpr55* Deletion.

### **6.8 Die *Gpr55* Deletion moduliert die Größe isolierter Immunzellpopulationen in Milz, Blut und perikardialem Fettgewebe**

Die Heraufregulation profibrotischer und proinflammatorischer Faktoren infolge der AngII Infusion war dabei genotypunabhängig nicht mit einem Anstieg der Leukozytenzahlen in Milz, Blut und Knochenmark assoziiert. Im Gegensatz zu den im Herzen beobachteten eher antiinflammatorischen Effekten der *Gpr55* Deletion im Rahmen der pathologischen Hypertrophie fiel unabhängig von der AngII Behandlung eine tendenziell erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten in Milz und Blut in KO Weibchen auf. Ein basaler proinflammatorischer Phänotyp *Gpr55* defizienter Mäuse mit einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in Blut und Knochenmark wurde bereits von Puhl et al. beschrieben (101). Dabei ist ein Einfluss einer erhöhten inflammatorischen Aktivität neutrophiler Granulozyten auf das kardiovaskuläre System nicht ausgeschlossen. Zum einen gilt eine Leukozytose als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zum anderen wurde basierend auf humanen und tierexperimentellen Daten neutrophilen Granulozyten eine mögliche modulatorische Rolle in der arteriellen Hypertonie zugeschrieben (49, 159). In KO Herzen war jedoch die Zahl von neutrophilen Granulozyten sowie die Expression des chemotaktisch wirkenden Zytokins *Ccl2* nicht erhöht. Dies steht im

Gegensatz zu den Beobachtungen von Puhl et al., die nicht nur eine systemische, sondern auch eine kardiale Vermehrung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen sowie eine erhöhte kardiale Expression von *Ccl2* in 8 Wochen alten KO Mäusen zeigten. Diese beruhte vermutlich auf einer mechanisch induzierten inflammatorischen Reaktion infolge der erhöhten diastolischen Vordehnung der KO Herzen (101). Ursächlich für die Diskrepanz könnte der Altersunterschied von 4 Wochen im Vergleich zu der hier untersuchten 12 Wochen alten Vehikelkohorte sein. Eine unterdessen erfolgte Adaptation an die kardiale Belastung könnte so einer Normalisierung der *Ccl2* Expression sowie der Zahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in KO Herzen zugrunde liegen. Vergleichbar damit bildet sich auch die inflammatorische Reaktion in Folge einer anhaltenden Volumenüberlastung in Ratten nach 5 Wochen zurück (160).

Darüber hinaus unterlag die angedeutete systemische Granulozytose infolge der *Gpr55* Deletion einer geschlechtsabhängigen Regulation. So war in der männlichen Kohorte die Zahl der myeloiden Zellen in der Zirkulation vermindert. Dies könnte auf eine Störung der Migration der Zellen aus dem Knochenmark in männlichen KO Tieren zurückzuführen sein. So konnten *in vitro* Studien bereits zeigen, dass GPR55 in die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten involviert ist (100, 161).

Zuletzt führte die *Gpr55* Deletion unabhängig vom Geschlecht zu einer reduzierten Zahl von Lymphozyten und myeloiden Zellen im perikardialen Fettgewebe. Nach Myokardinfarkt wurde bereits eine Modulation der inflammatorischen Antwort und Fibrose durch B-Zellcluster im murinen, perikardialen Fett beschrieben (109, 162). Zudem korreliert das Volumen des epikardialen Fetts in Menschen mit dem Ausmaß einer diastolischen Dysfunktion (163). Somit ist der Einfluss der *Gpr55* Deletion auf die Immunzellpopulation im perikardialen Fett ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von GPR55 im hämatopoetischen System und dessen mögliche Involvierung im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen.

### **6.9 Schlussfolgerung: Die *Gpr55* Deletion beugt dem maladaptiven Remodeling im Rahmen der AngII-induzierten pathologischen Hypertrophie vor**

Eine anhaltende Stimulation des neurohumoralen Systems im Herzen ist mit der Aktivierung der prohypertrophen Signaltransduktion, der Ausschüttung profibrotischer Faktoren und einer kardialen Entzündungsreaktion assoziiert (3, 11, 53). Darüber hinaus tragen eine Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion sowie eine Modulation des Kalziumhaushaltes und des kardialen Metabolismus im Verlauf zur Abnahme der kardialen Funktion bei (11, 33, 36). Zusammenfassend hatte eine *Gpr55* Deletion in der AngII-induzierten Hypertrophie keinen Einfluss auf das strukturelle Remodeling, aber wirkte zentralen maladaptiven Prozessen entgegen. Sie führte hierbei im Rahmen einer pathologischen Hypertrophie zu einer Suppression der fetalen Genexpression, zur Inhibition einer Heraufregulation von *Ctgf* und *Il-6* sowie

---

zum Erhalt der  $\beta$ -adrenergen Reserve, resultierend in einer positiv inotropen Reaktion auf die AngII Behandlung.

Dies bestätigt, dass GPR55 in der Etablierung des hypertrophen Remodelings involviert ist und einen Vermittler zahlreicher pathologischer Merkmale darstellt. Zudem ergaben sich Hinweise, dass GPR55 in Weibchen zu den Regulatoren des kardialen Energiestoffwechsels und der kardialen Kalziumhomöostase zählt.

Es wurde bereits berichtet, dass Cannabidiol, welches GPR55 antagonisiert, im Mausmodell protektiv im Rahmen der diabetischen und Doxorubicin induzierten Kardiomyopathie wirkt (128, 146). Die vorliegende Studie weist nun darauf hin, dass sich die Inhibition von *Gpr55* auch günstig auf das druckinduzierte Remodeling auswirkt. Dabei konnten neben geschlechtsunabhängigen protektiven Auswirkungen einer *Gpr55* Deletion insbesondere in der weiblichen Kohorte kardioprotektive, funktionelle und metabolische Effekte näher charakterisiert werden. Daher könnte eine GPR55 Inhibition vor allem für weibliche Patienten, die stärker von der druckinduzierten konzentrischen Hypertrophie betroffen sind, einen neuartigen Behandlungsansatz darstellen. Dabei sollten jedoch vor einem therapeutischen Einsatz GPR55 hemmender Wirkstoffe mögliche Wechselwirkungen mit dem zentralen Nervensystem, dem hämatopoetischen System und dem Stoffwechsel beachtet und in Zukunft näher charakterisiert werden.

1. Summary tables of mortality estimates by cause, age and sex, globally and by region, 2000–2019. World Health Organization; Geneva, 2020. [Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>.]
2. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367(9507):356-67.
3. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015;89(9):1401-38.
4. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(7):387-407.
5. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97:245-62.
6. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):30-8.
7. van Thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AH. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2015;763(Pt A):3-14.
8. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation*. 2011;124(23):2491-501.
9. Simmonds SJ, Cuijpers I, Heymans S, Jones EAV. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. *Cells*. 2020;9(1).
10. Tomanek RJ. Response of the coronary vasculature to myocardial hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(3):528-33.
11. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191-227.
12. Puhl SL, Kazakov A, Muller A, Fries P, Wagner DR, Bohm M, et al. Adenosine A1 receptor activation attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in response to alpha1 -adrenoceptor stimulation in vivo. *Br J Pharmacol*. 2016;173(1):88-102.
13. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C82-97.
14. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*. 2004;10(3):248-54.
15. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, et al. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9320-5.
16. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11114-9.
17. Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, Comoglio P, Crepaldi T. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
18. Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2009;15(1):75-83.
19. Mutlak M, Schlesinger-Laufer M, Haas T, Shofti R, Ballan N, Lewis YE, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation preserves cardiac function in pressure overload induced hypertrophy. *Int J Cardiol*. 2018;270:204-13.
20. Li XM, Ma YT, Yang YN, Liu F, Chen BD, Han W, et al. Downregulation of survival signalling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(11):1054-61.

21. Romero-Becerra R, Santamans AM, Folgueira C, Sabio G. p38 MAPK Pathway in the Heart: New Insights in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
22. Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 2006;20(24):3347-65.
23. Molkenin JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:391-426.
24. Dirx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2414-24.
25. Green NK, Franklyn JA, Ohanian V, Heagerty AM, Gammage MD. Transfection of cardiac muscle: effects of overexpression of c-myc and c-fos proto-oncogene proteins in primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes. *Clin Sci (Lond).* 1997;92(2):181-8.
26. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(2):339-43.
27. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, et al. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(39):14471-6.
28. Sergeeva IA, Christoffels VM. Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2403-13.
29. Dorn GW, 2nd, Robbins J, Ball N, Walsh RA. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aortic-banded mice. *Am J Physiol.* 1994;267(1 Pt 2):H400-5.
30. Jeong MY, Kinugawa K, Vinson C, Long CS. AFos dissociates cardiac myocyte hypertrophy and expression of the pathological gene program. *Circulation.* 2005;111(13):1645-51.
31. Baker AJ. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch.* 2014;466(6):1139-50.
32. Colucci WS, Ribeiro JP, Rocco MB, Quigg RJ, Creager MA, Marsh JD, et al. Impaired chronotropic response to exercise in patients with congestive heart failure. Role of postsynaptic beta-adrenergic desensitization. *Circulation.* 1989;80(2):314-23.
33. Dewenter M, von der Lieth A, Katus HA, Backs J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121(8):1000-20.
34. Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J. Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Res Cardiol.* 2018;113(4):29.
35. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):457-70.
36. Tuomainen T, Tavi P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Exp Cell Res.* 2017;360(1):12-8.
37. Riehle C, Abel ED. PGC-1 proteins and heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2012;22(4):98-105.
38. Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Hue L. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):224-33.
39. Geraets IME, Glatz JFC, Luiken J, Nabben M. Pivotal role of membrane substrate transporters on the metabolic alterations in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res.* 2019;115(6):1000-12.
40. Abel ED. Insulin signaling in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021;321(1):E130-E45.
41. Morisco C, Lembo G, Trimarco B. Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16(6):183-8.
42. Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2021;117(6):1450-88.
43. Frangogiannis NG. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ Res.* 2019;125(1):117-46.

44. Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(2):477-81.
45. Behnes M, Brueckmann M, Lang S, Weiss C, Ahmad-Nejad P, Neumaier M, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2): diagnostic and prognostic value in acute heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2014;103(2):107-16.
46. Koshman YE, Sternlicht MD, Kim T, O'Hara CP, Koczor CA, Lewis W, et al. Connective tissue growth factor regulates cardiac function and tissue remodeling in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):214-22.
47. Vainio LE, Szabo Z, Lin R, Ulvila J, Yrjola R, Alakoski T, et al. Connective Tissue Growth Factor Inhibition Enhances Cardiac Repair and Limits Fibrosis After Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 2019;4(1):83-94.
48. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-23.
49. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(12):733-44.
50. Wang NP, Erskine J, Zhang WW, Zheng RH, Zhang LH, Duron G, et al. Recruitment of macrophages from the spleen contributes to myocardial fibrosis and hypertension induced by angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2017;18(2):1470320317706653.
51. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):91-104.
52. Lafuse WP, Wozniak DJ, Rajaram MVS. Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells.* 2020;10(1).
53. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation.* 2015;131(11):1019-30.
54. Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, Lairez O, Tortosa F, Vinel C, et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. *Circulation.* 2014;129(21):2111-24.
55. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* 2007;204(10):2449-60.
56. Chan CT, Sobey CG, Lieu M, Ferens D, Kett MM, Diep H, et al. Obligatory Role for B Cells in the Development of Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Hypertension.* 2015;66(5):1023-33.
57. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J.* 2017;38(3):187-97.
58. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1627-738.
59. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2021;42(36):3599-726.
60. Munoz-Durango N, Fuentes CA, Castillo AE, Gonzalez-Gomez LM, Vecchiola A, Fardella CE, et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).
61. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:439-65.
62. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):363-82.

63. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2005;111(8):1006-11.
64. Xu J, Sun Y, Carretero OA, Zhu L, Harding P, Shesely EG, et al. Effects of cardiac overexpression of the angiotensin II type 2 receptor on remodeling and dysfunction in mice post-myocardial infarction. *Hypertension*. 2014;63(6):1251-9.
65. van Vark LC, Bertrand M, Akkerhuis KM, Brugs JJ, Fox K, Mourad JJ, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158,998 patients. *Eur Heart J*. 2012;33(16):2088-97.
66. Emdin CA, Callender T, Cao J, McMurray JJ, Rahimi K. Meta-Analysis of Large-Scale Randomized Trials to Determine the Effectiveness of Inhibition of the Renin-Angiotensin Aldosterone System in Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2015;116(1):155-61.
67. Gesundheit in Deutschland. Robert Koch Institut; Berlin, 2015. [Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit\\_in\\_deutschland\\_2015.html?nn=2379316](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit_in_deutschland_2015.html?nn=2379316).]
68. World Drug Report 2021. United Nations publications, Sales No. E.21.XI.8; Vienna, 2021. [Available from: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html>.]
69. Puhl SL. Cannabinoid-sensitive receptors in cardiac physiology and ischaemia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019.
70. Pacher P, Steffens S, Hasko G, Schindler TH, Kunos G. Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad, and the ugly. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(3):151-66.
71. Henstridge CM, Balenga NA, Kargl J, Andradas C, Brown AJ, Irving A, et al. Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol Endocrinol*. 2011;25(11):1835-48.
72. Sharir H, Abood ME. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther*. 2010;126(3):301-13.
73. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):588-631.
74. Pineiro R, Falasca M. Lysophosphatidylinositol signalling: new wine from an old bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(4):694-705.
75. Drzazga A, Sowinska A, Krzeminska A, Rytczak P, Koziolkiewicz M, Gendaszewska-Darmach E. Lysophosphatidylcholine elicits intracellular calcium signaling in a GPR55-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;489(2):242-7.
76. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-101.
77. Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, et al. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29817-27.
78. Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, et al. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 10):1704-17.
79. Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2699-704.
80. Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling and NFAT activation. *FASEB J*. 2009;23(1):183-93.
81. Henstridge CM, Balenga NA, Schroder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, et al. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):604-14.

82. Pineiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2011;30(2):142-52.
83. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(4):928-34.
84. Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem*. 2010;147(5):671-8.
85. Liu B, Song S, Jones PM, Persaud SJ. GPR55: from orphan to metabolic regulator? *Pharmacol Ther*. 2015;145:35-42.
86. Daly CJ, Ross RA, Whyte J, Henstridge CM, Irving AJ, McGrath JC. Fluorescent ligand binding reveals heterogeneous distribution of adrenoceptors and 'cannabinoid-like' receptors in small arteries. *Br J Pharmacol*. 2010;159(4):787-96.
87. Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, et al. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*. 2007;152(5):825-31.
88. Bondarenko A, Waldeck-Weiermair M, Naghdi S, Poteser M, Malli R, Graier WF. GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2010;161(2):308-20.
89. AlSuleimani YM, Hiley CR. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol relaxes rat mesenteric resistance artery and induces Ca(2+) release in rat mesenteric artery endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2015;172(12):3043-57.
90. Walsh SK, Hector EE, Andreasson AC, Jonsson-Rylander AC, Wainwright CL. GPR55 deletion in mice leads to age-related ventricular dysfunction and impaired adrenoceptor-mediated inotropic responses. *PLoS One*. 2014;9(9):e108999.
91. Walsh SK, Lipina C, Ang SY, Sato M, Chia LY, Kocan M, et al. GPR55 regulates the responsiveness to, but does not dimerise with, alpha1A-adrenoceptors. *Biochem Pharmacol*. 2021;188:114560.
92. Yu J, Deliu E, Zhang XQ, Hoffman NE, Carter RL, Grisanti LA, et al. Differential activation of cultured neonatal cardiomyocytes by plasmalemmal versus intracellular G protein-coupled receptor 55. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22481-92.
93. Marichal-Cancino BA, Fajardo-Valdez A, Ruiz-Contreras AE, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O. Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(5):771-8.
94. Meadows A, Lee JH, Wu CS, Wei Q, Pradhan G, Yafi M, et al. Deletion of G-protein-coupled receptor 55 promotes obesity by reducing physical activity. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(3):417-24.
95. Romero-Zerbo SY, Rafacho A, Diaz-Arteaga A, Suarez J, Quesada I, Imbernon M, et al. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *J Endocrinol*. 2011;211(2):177-85.
96. Moreno-Navarrete JM, Catalan V, Whyte L, Diaz-Arteaga A, Vazquez-Martinez R, Rotellar F, et al. The L-alpha-lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes*. 2012;61(2):281-91.
97. Kurano M, Suzuki A, Inoue A, Tokuhara Y, Kano K, Matsumoto H, et al. Possible involvement of minor lysophospholipids in the increase in plasma lysophosphatidic acid in acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):463-70.
98. Rinne P, Guillamat-Prats R, Rami M, Bindila L, Ring L, Lyytikainen LP, et al. Palmitoylethanolamide Promotes a Proresolving Macrophage Phenotype and Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(11):2562-75.
99. Yang H, Zhou J, Lehmann C. GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016;27(3):297-302.
100. Balenga NA, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schroder R, Blattermann S, et al. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res*. 2011;21(10):1452-69.

101. Puhl SL, Hilby M, Kohlhaas M, Keidel LM, Jansen Y, Hristov M, et al. Haematopoietic and cardiac GPR55 synchronize post-myocardial infarction remodelling. *Sci Rep.* 2021;11(1):14385.
102. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(1):9-29.
103. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
104. Puhl SL, Weeks KL, Ranieri A, Avkiran M. Assessing structural and functional responses of murine hearts to acute and sustained beta-adrenergic stimulation in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;79:60-71.
105. Schopohl B, Kohlhaas M, Nickel AG, Schiuma AF, Maas SL, van der Vorst EPC, et al. Gpr55 deficiency crucially alters cardiomyocyte homeostasis and counteracts angiotensin II induced maladaptation in female mice. *Br J Pharmacol.* 2024; DOI: 10.1111/bph.17350.
106. Lipina C, Walsh SK, Mitchell SE, Speakman JR, Wainwright CL, Hundal HS. GPR55 deficiency is associated with increased adiposity and impaired insulin signaling in peripheral metabolic tissues. *FASEB J.* 2019;33(1):1299-312.
107. Klopffleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers. *Acta Biomater.* 2016;43:3-13.
108. Ma F, Li Y, Jia L, Han Y, Cheng J, Li H, et al. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF beta/Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PLoS One.* 2012;7(5):e35144.
109. Horckmans M, Bianchini M, Santovito D, Megens RTA, Springael JY, Negri I, et al. Pericardial Adipose Tissue Regulates Granulopoiesis, Fibrosis, and Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation.* 2018;137(9):948-60.
110. Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:53-70.
111. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;259(1):8-14.
112. Singh MV, Cicha MZ, Nunez S, Meyerholz DK, Chapleau MW, Abboud FM. Angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy are differentially mediated by TLR3- and TLR4-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;316(5):H1027-H38.
113. Kopaliani I, Jarzebska N, Billoff S, Kolouschek A, Martens-Lobenhoffer J, Bornstein SR, et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 protects from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;321(5):H825-H38.
114. Haudek SB, Cheng J, Du J, Wang Y, Hermosillo-Rodriguez J, Trial J, et al. Monocytic fibroblast precursors mediate fibrosis in angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(3):499-507.
115. Peng H, Yang XP, Carretero OA, Nakagawa P, D'Ambrosio M, Leung P, et al. Angiotensin II-induced dilated cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice. *Exp Physiol.* 2011;96(8):756-64.
116. Lin L, Gong H, Ge J, Jiang G, Zhou N, Li L, et al. High density lipoprotein downregulates angiotensin II type 1 receptor and inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404(1):28-33.
117. Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res.* 1993;73(3):439-47.
118. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):931-6.
119. Deschepper CF, Llamas B. Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside. *Hypertension.* 2007;49(3):401-7.

120. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Prescott E, Franconi F, Gerdtts E, Foryst-Ludwig A, et al. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J*. 2016;37(1):24-34.
121. Pedzinska-Betiuk A, Weresa J, Schlicker E, Harasim-Symbor E, Toczek M, Kasacka I, et al. Chronic cannabidiol treatment reduces the carbachol-induced coronary constriction and left ventricular cardiomyocyte width of the isolated hypertensive rat heart. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021;411:115368.
122. Lu Y, Akinwumi BC, Shao Z, Anderson HD. Ligand activation of cannabinoid receptors attenuates hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64(5):420-30.
123. Ruginsk SG, Uchoa ET, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. Cannabinoid CB1 receptor mediates glucocorticoid effects on hormone secretion induced by volume and osmotic changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(2):151-4.
124. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):993-1004.
125. Pellieux C, Sauthier T, Aubert JF, Brunner HR, Pedrazzini T. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy is associated with different mitogen-activated protein kinase activation in normotensive and hypertensive mice. *J Hypertens*. 2000;18(9):1307-17.
126. Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao H. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res*. 1998;83(7):752-60.
127. Nishida K, Yamaguchi O, Hirotani S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, et al. p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10611-20.
128. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Patel V, Saito K, Matsumoto S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(25):2115-25.
129. Palomeque J, Delbridge L, Petroff MV. Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(13):5118-33.
130. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, et al. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation*. 1990;82(6):1973-84.
131. Miklos Z, Wafa D, Nadasy GL, Toth ZE, Besztercei B, Dornyei G, et al. Angiotensin II-Induced Cardiac Effects Are Modulated by Endocannabinoid-Mediated CB1 Receptor Activation. *Cells*. 2021;10(4).
132. Kargl J, Balenga N, Parzmair GP, Brown AJ, Heinemann A, Waldhoer M. The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *J Biol Chem*. 2012;287(53):44234-48.
133. Nikolovska Vukadinovic A, Vukadinovic D, Borer J, Cowie M, Komajda M, Lainscak M, et al. Heart rate and its reduction in chronic heart failure and beyond. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(10):1230-41.
134. Kicman A, Toczek M. The Effects of Cannabidiol, a Non-Intoxicating Compound of Cannabis, on the Cardiovascular System in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18).
135. Kossakowski R, Schlicker E, Toczek M, Weresa J, Malinowska B. Cannabidiol Affects the Bezold-Jarisch Reflex via TRPV1 and 5-HT3 Receptors and Has Peripheral Sympathomimetic Effects in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Front Pharmacol*. 2019;10:500.
136. Kirilly E, Hunyady L, Bagdy G. Opposing local effects of endocannabinoids on the activity of noradrenergic neurons and release of noradrenaline: relevance for their role in depression and in the actions of CB(1) receptor antagonists. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(1):177-86.
137. Zhou W, Guan Z. Ion Channels in Anesthesia. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1349:401-13.

138. Marichal-Cancino BA, Manrique-Maldonado G, Altamirano-Espinoza AH, Ruiz-Salinas I, Gonzalez-Hernandez A, Maassenvandenbrink A, et al. Analysis of anandamide- and lysophosphatidylinositol-induced inhibition of the vasopressor responses produced by sympathetic stimulation or noradrenaline in pithed rats. *Eur J Pharmacol.* 2013;721(1-3):168-77.
139. Baier MJ, Klatt S, Hammer KP, Maier LS, Rokita AG. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is essential in hyperacute pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2020;138:212-21.
140. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(3):354-61.
141. Ahmad T, Miller PE, McCullough M, Desai NR, Riello R, Psocka M, et al. Why has positive inotropy failed in chronic heart failure? Lessons from prior inotrope trials. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(9):1064-78.
142. Hasenfuss G, Teerlink JR. Cardiac inotropes: current agents and future directions. *Eur Heart J.* 2011;32(15):1838-45.
143. Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, et al. Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ Heart Fail.* 2010;3(3):420-30.
144. Degens H, de Brouwer KF, Gilde AJ, Lindhout M, Willemsen PH, Janssen BJ, et al. Cardiac fatty acid metabolism is preserved in the compensated hypertrophic rat heart. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(1):17-26.
145. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005;1(4):259-71.
146. Hao E, Mukhopadhyay P, Cao Z, Erdelyi K, Holovac E, Liaudet L, et al. Cannabidiol Protects against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Modulating Mitochondrial Function and Biogenesis. *Mol Med.* 2015;21:38-45.
147. Young ME, Yan J, Razeghi P, Cooksey RC, Guthrie PH, Stepkowski SM, et al. Proposed regulation of gene expression by glucose in rodent heart. *Gene Regul Syst Bio.* 2007;1:251-62.
148. Taegtmeier H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1188:191-8.
149. Wargent ET, Kepczynska M, Zaibi MS, Hislop DC, Arch JRS, Stocker CJ. High fat-fed GPR55 null mice display impaired glucose tolerance without concomitant changes in energy balance or insulin sensitivity but are less responsive to the effects of the cannabinoids rimonabant or Delta(9)-tetrahydrocannabinol on weight gain. *PeerJ.* 2020;8:e9811.
150. Tornatore TF, Dalla Costa AP, Clemente CF, Judice C, Rocco SA, Calegari VC, et al. A role for focal adhesion kinase in cardiac mitochondrial biogenesis induced by mechanical stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(3):H902-12.
151. Antoniak S, Cardenas JC, Buczek LJ, Church FC, Mackman N, Pawlinski R. Protease-Activated Receptor 1 Contributes to Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Inflammation. *Cardiology.* 2017;136(4):258-68.
152. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.* 2009;131(4):471-81.
153. Mayr M, Duerschmid C, Medrano G, Taffet GE, Wang Y, Entman ML, et al. TNF/Ang-II synergy is obligate for fibroinflammatory pathology, but not for changes in cardiorenal function. *Physiol Rep.* 2016;4(8).
154. Szabo Z, Magga J, Alakoski T, Ulvila J, Pihola J, Vainio L, et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension.* 2014;63(6):1235-40.
155. Gonzalez GE, Rhaleb NE, D'Ambrosio MA, Nakagawa P, Liu Y, Leung P, et al. Deletion of interleukin-6 prevents cardiac inflammation, fibrosis and dysfunction without affecting

- 
- blood pressure in angiotensin II-high salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2015;33(1):144-52.
156. Brzezinski RY, Ovadia-Blechman Z, Lewis N, Rabin N, Zimmer Y, Levin-Kotler L, et al. Non-invasive thermal imaging of cardiac remodeling in mice. *Biomed Opt Express.* 2019;10(12):6189-203.
157. Tang X, Wang P, Zhang R, Watanabe I, Chang E, Vinayachandran V, et al. KLF2 regulates neutrophil activation and thrombosis in cardiac hypertrophy and heart failure progression. *J Clin Invest.* 2022;132(3).
158. Patel B, Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Prabhu SD. Mononuclear Phagocytes Are Dispensable for Cardiac Remodeling in Established Pressure-Overload Heart Failure. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170781.
159. Araos P, Figueroa S, Amador CA. The Role of Neutrophils in Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).
160. Chen YW, Pat B, Gladden JD, Zheng J, Powell P, Wei CC, et al. Dynamic molecular and histopathological changes in the extracellular matrix and inflammation in the transition to heart failure in isolated volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(6):H2251-60.
161. Li X, Hanafusa K, Kage M, Yokoyama N, Nakayama H, Hotta T, et al. Lysophosphatidylglucoside is a GPR55 -mediated chemotactic molecule for human monocytes and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;569:86-92.
162. Wu L, Dalal R, Cao CD, Postoak JL, Yang G, Zhang Q, et al. IL-10-producing B cells are enriched in murine pericardial adipose tissues and ameliorate the outcome of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(43):21673-84.
163. Ansaldo AM, Montecucco F, Sahebkar A, Dallegri F, Carbone F. Epicardial adipose tissue and cardiovascular diseases. *Int J Cardiol.* 2019;278:254-60.

---

## Publikationen

### Originalarbeiten:

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in gleicher oder ähnlicher Darstellung in der internationalen Fachzeitschrift *British Journal of Pharmacology* als Originalarbeit veröffentlicht.

**Schopohl B**, Kohlhaas M, Nickel AG, Schiuma AF, Maas SL, van der Vorst EPC, Shia YX, Maack C, Steffens S, Puhl SL (2024). *Gpr55* deficiency crucially alters cardiomyocyte homeostasis and counteracts angiotensin II induced maladaptation in female mice. *British Journal of Pharmacology*. DOI: 10.1111/bph.17350.

### Abstract Publikationen:

1. Puhl SL, **Schopohl B**, Kohlhaas M, Schiuma AF, Nickel AG, Shia YX, Maack C, Steffens S (2022). GPR55 deficiency increases  $Ca^{2+}$  concentration, accelerates sarcomere contraction kinetics and mitochondrial respiration and mitigates angiotensin II induced maladaptive hypertrophy. Annual meeting of the German Society of Cardiology (DGK), Mannheim, Germany
2. **Schopohl B**, Puhl SL, Steffens S (2019). GPR55 deficiency prevents maladaptation and increases inotropy in angiotensinII-induced hypertrophy. Autumn meeting of the German Society of Cardiology (DGK), Berlin, Germany
3. Puhl SL, **Schopohl B**, Hilby M, Steffens S (2019). Cannabinoid-sensitive receptor GPR55 deficiency impairs left ventricular hypertrophy independent of the pathological hypertrophic stimulus in mice. Joined meeting of the German Centre for Cardiovascular Diseases (DZHK) and the German Comprehensive Heart Failure Centre (DZHI), Würzburg, Germany
4. **Schopohl B**, Puhl SL, Steffens S (2019). GPR55 deficiency prevents maladaptation and increases inotropy in angiotensinII-induced hypertrophy. Munich Heart Alliance (MHA) Summer Meeting, Starnberg, Germany
5. Puhl SL, **Schopohl B**, Hilby M, Steffens S (2019). Cannabinoid-sensitive receptor GPR55 in ischemic and non-ischemic cardiac stress. Munich Heart Alliance (MHA) Winter Meeting, Munich, Germany
6. **Schopohl B**, Puhl SL, Steffens S (2018). Cannabinoid-sensitive receptor GPR55 deficiency impairs left ventricular hypertrophy independent of the pathological hypertrophic stimulus in mice. Autumn meeting of the German Society of Cardiology (DGK), Berlin, Germany

### Förderung:

Die vorliegende Dissertation wurde durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie e.V. (DGK) gefördert.

## Danksagung

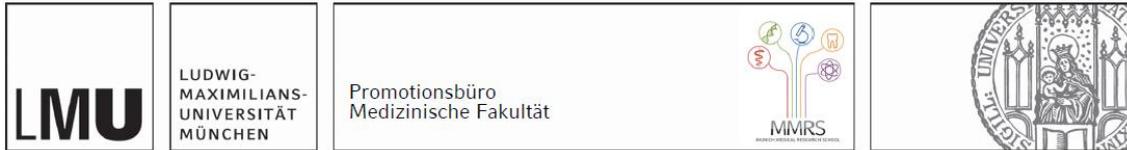
Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sabine Steffens für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Unterstützung meiner Promotion und die Möglichkeit an Kongressen teilnehmen zu können. Danke für dein Vertrauen, die Diskussionen, Vorschläge und konstruktive Kritik sowie die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Sarah-Lena Puhl für die ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit. Danke liebe Sarah für Alles, was ich von dir lernen durfte, für alle Fehler, die du erkannt hast, bevor ich sie machen konnte, für die vielen Gespräche, die Inspirationen, Ideen und die Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten. Danke für all die Arbeit an unserer Publikation, die Korrekturen von Vorträgen, Postern und nicht zuletzt meiner Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere bei Linus, Raquel, Bigni, Yong und Martina, für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das viele Lachen bedanken. Danke auch an Shia für die tolle Unterstützung beim Bilderaufnehmen und Sirius Red Färben.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei Yvonne für die Hilfsbereitschaft und die schönen Momente. Des Weiteren danke ich Sascha, Cornelia, Harsha und Haron für die gute Zeit im Labor und beim morgendlichen Kaffeetrinken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Freunden und bei dir, Emanuel, für die Geduld, das Verständnis und dafür, dass ihr immer für mich da wart und seid.



### Eidesstattliche Versicherung

Schopohl, Brigitte

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### **Die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Rezeptors GPR55 im Angiotensin II-induzierten linksventrikulären Remodeling**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.07.2025

Ort, Datum

Brigitte Schopohl

Unterschrift Doktorandin



Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



### **Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung**

Ihr Name:           Brigitte Schopohl

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

**Die Rolle des Cannabinoid-sensitiven Rezeptors GPR55 im Angiotensin II-induzierten  
linksventrikulären Remodeling**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt

München, 28.07.2025

Ort, Datum

Brigitte Schopohl

Unterschrift Brigitte Schopohl