

Aus dem Institut Pharmakologie und Toxikologie  
(Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Rolle der Phosphodiesterase 2 in der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Julius Emons

aus

Eutin

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in Prof. Dr. med. A. El-Armouche

Ko-Referent/in: Dr. Axel Kaul

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: 17.10.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Rolle der Phosphodiesterase 2 in der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 04.02.2017

.....

(Unterschrift)

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1 Klinik der Herzinsuffizienz.....	1
1.1.2 Die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade und ihr Einfluss auf die Herzaktivität .....	2
1.1.3 Störung der $\beta$ -adrenergen Signalkaskade .....	3
1.1.4 cAMP- und cGMP-Signalweg .....	3
1.1.5 Phosphodiesterasen-Superfamilie .....	4
1.1.6 Phosphodiesterasen in Herzmuskelzellen.....	6
1.1.7 Phosphodiesterase 2 (PDE2).....	6
1.2 Zielsetzung.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Klonierung.....	10
2.1.1 Restriktionsverdau.....	10
2.1.2 DNA-Gelaufreinigung.....	10
2.1.3 Ligation .....	10
2.1.4 Ansatz von LB-Medium.....	10
2.1.5 Transformation von PDE2A3-Plasmid-DNA in hitzekompetente Bakterien.....	11
2.1.6 Transformation von PDE2- Plasmid-DNA in elektrokompente Zellen.....	11
2.1.7 Animpfen einer Schüttelkultur .....	11
2.1.8 Mini-Plasmidpräparation aus einer Schüttelkultur .....	11
2.1.9 Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen .....	12
2.1.10 Isolation großer Plasmid-DNA-Mengen durch Ionenaustauscher-Säule .....	12
2.2 Adenovirale Expressionssysteme .....	14

2.2.1	Klonierung des PDE2-Konstrukts in den pAD-Track CMV- Vektor.....	14
2.2.2	Linearisierung und Aufreinigung des pAd-Track-PDE2-CMV .....	15
2.2.3	Homologe Rekombination mit dem Ad-Easy-System.....	15
2.2.4	Herstellung Rekombinanter Adenovieren in HEK293-Zellen.....	15
2.3	Modelle der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz .....	17
2.4	Chronisches beta-adrenerges Stressmodell in der Ratte .....	18
2.4.1	Implantation von osmotischen Mini-Pumpen .....	18
2.4.2	Organentnahmen.....	18
2.4.3	Großtiermodell der Herzinsuffizienz in Rapid-Paced-Hunden .....	18
2.5	RNA-Analysen .....	20
2.5.1	Isolation von RNA.....	20
2.5.2	Reverse Transkription.....	20
2.5.3	Real-Time PCR.....	20
2.6	Proteinanalytische Methoden.....	21
2.6.1	Proteingewinnung aus Gewebe für Immunoblot-Analysen.....	21
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	21
2.6.3	Bestimmung der Proteinexpression.....	21
2.7	PDE2-Aktivitäts-Assay .....	23
2.8	Bestimmung der zellulären Hypertrophie .....	24
2.9	Statistische Auswertung.....	25
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Herstellung des rekombinanten PDE2-Adenovirus.....	26
3.1.1	Klonierung des pAdTrack-PDE2-CMV Shuttle-Vektors .....	26
3.1.2	Homologe Rekombination von pAd-Track-PDE2-CMV und pAdEasy .....	27
3.1.3	Viral überexprimierte PDE2 in neonatalen Rattenherzmuskelzellen .....	28
3.2	Spezifität des PDE2-Antikörpers.....	29
3.3	Endogene PDE2-Expression in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten .....	30
3.4	PDE2-Expression in der menschlichen Herzinsuffizienz.....	31

3.4.1	Klinische Daten der Spenderpatienten .....	31
3.4.2	PDE2 ist in der menschlichen Herzinsuffizienz hochreguliert .....	33
3.4.3	PDE2 ist bei Patienten mit Aortenstenose nicht reguliert .....	34
3.4.4	PDE2-Expression ist unabhängig von einer Betablocker-Einnahme .....	35
3.5	PDE2-Expression in der induzierten Herzinsuffizienz im Großtiermodell .....	36
3.6	PDE2-Expression und -Aktivität im linksventrikulären Myokard von Ratten nach chronischer beta-adrenerger Stimulation durch Isoprenalin .....	37
3.6.1	Herz- / Körpergewicht und ANP-Expression im Modell der chronischen adrenergen Stimulation .....	38
3.6.2	PDE2-Expression im Isoprenalin-Modell ist auf Ebene der Transkription reguliert .....	39
3.6.3	PDE2- cAMP- und cGMP-Aktivität im Rattenmodell .....	40
3.7	PDE2-Überexpression schützt Herzmuskelzellen vor $\alpha/\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie .....	41
3.8	PDE2-Lokalisation .....	43
3.8.1	PDE2A3-Lokalisation in adulten Ratten-Herzmuskelzellen .....	43
4	Diskussion .....	44
4.1.1	PDE2 ist in der Herzinsuffizienz hochreguliert .....	44
4.1.2	PDE2-Hochregulation als Folge von chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation .....	45
4.1.3	PDE2-Überexpression schützt vor $\alpha/\beta$ -AR induzierter Hypertrophie .....	46
4.1.4	Viral überexprimierte PDE2A3 stellt sich entlang definierter Linien des Sarkomers dar .....	47
4.2	Limitationen .....	49
4.3	Klinische Relevanz und Neuheit der Ergebnisse .....	49
5	Zusammenfassung .....	50
6	Anhang .....	52
6.1	PCR-Ansätze und Bedingungen .....	52
6.2	Antikörper .....	54
6.3	Substanzen .....	55

6.4	Hilfsmittel und Geräte .....	57
7	Literaturverzeichnis .....	59
7.1	Internetquellen .....	65

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der PDE2 im cAMP- und cGMP-Signalweg.....	8
Abbildung 2: Generierung des PDE2-pAD-Track-CMV. ....	26
Abbildung 3: Verdau von pAd-Easy-PDE2A3 nach der homologen Rekombination.....	27
Abbildung 4: Ad-PDE2- infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten.....	28
Abbildung 5: Spezifität des PDE2-Antikörpers .....	29
Abbildung 6: Endogene Expression der PDE2 in neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	30
Abbildung 7: PDE2 ist in der menschlichen Herzinsuffizienz hochreguliert .....	33
Abbildung 8: PDE2 ist bei Patienten mit Aortenstenose nicht reguliert.....	34
Abbildung 9: PDE2-Expression ist unabhängig von Betablocker-Einnahme .....	35
Abbildung 10: PDE2 ist in der experimentellen Herzinsuffizienz hochreguliert.....	36
Abbildung 11: Auswirkung von chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation auf Herzgewicht und ANP-Transkription.....	38
Abbildung 12: PDE2 ist in der durch Isoprenalin induzierten Herzinsuffizienz hochreguliert.....	39
Abbildung 13: Höhere PDE2-Protein-Spiegel resultieren in einer erhöhten PDE2-Aktivität.....	40
Abbildung 14: PDE2-Überexpression schützt Herzmuskelzellen vor durch $\alpha$ - und $\beta$ -adrenerge Stimulation hervorgerufener Hypertrophie .....	42
Abbildung 15: Viral überexprimierte PDE2A3 ist entlang definierter Linien lokalisiert.....	43



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht der PDE-Enzymfamilie .....	5
Tabelle 2: Patienten-Charakteristika .....	31
Tabelle 3: PCR-Bedingungen.....	52
Tabelle 4: PCR-Ansätze.....	53
Tabelle 5: Antikörper .....	54
Tabelle 6: Substanzen .....	55
Tabelle 7: Hilfsmittel und Geräte.....	57

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AC	Adenylylzyklase
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin-Konversions-Enzym
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aortenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
β-AR	β-Adrenozeptor
BB	β-Blocker
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
Bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
cAMP/GMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat/Guanosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CI	Herzindex
CF	Cardiac Fibroblast
CM	Herzmuskelzelle
CMV	Zytomegalie-Virus
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO	<i>Cardiac output</i> , Herzminutenvolumen
Cpm	<i>Counts per minute</i> , Zählungen pro Minute
CSQ	Calsequestrin
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
doi	Digitaler Objekte-Identifizierer
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EF	Ejektionsfraktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine
FIB	Fibroblast
For	<i>Forward 5'-3' Primer</i> , Vorwärts 5'-3' Primer
g	Gramm
GAF-A/B-Domäne	cGMP-, <u>A</u> C- und <u>F</u> hlA-Bindungsdomäne
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidinthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Humanes Influenza-Hemagglutinin
HG	Herzgewicht
HCN-Kanal	Hyperpolarisationsaktivierte zyklische Nukleotid-verstärkte Kationenkanäle
HF	Herzfrequenz
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> , menschliche embryonale Nierenzelle
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HW	Herzgewicht
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
ISO	Isoprenalin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaeliskonstante
KG	Körpergewicht
Ctr	Positivkontrolle
l	Liter
LTCC	L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
m	Meter
mg	Milligramm

M	Mol/l
MHC	<i>Myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosins
MHz	Megahertz
Min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Basiseinheit der Stoffmenge
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
no	Nummer
NO	Stickstoffmonoxid
NOR	Norepinephrine
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NF	<i>Non failing</i> , gesunde Spender
NYHA	New York Heart Association
pA	PolyA
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
GC-A	<i>Particulate guanylate cyclase</i> , transmembranöse Guanylylzyklase
pH	pH-Wert
PHE	Phenylephrin
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban
PolyA	Polyadenylierungs-Region
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
Rev	<i>Reverse 3'-5' Primer</i> ‚Rückwärts 3'-5' Primer
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	<i>Realtime PCR</i> , Echtzeit-PCR
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat

Sec	Sekunde
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylylzyklase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TnI	Troponin-I
U	<i>Units</i> ; Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
VASP	Vasodilatation-stimulierendes Phosphoprotein
V	Volt
$V_{\max}$	Maximale Enzymgeschwindigkeit
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist einer der häufigsten Gründe für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Die ESC (*European Society of Cardiology*) erhebt Daten einer Population von 900 Millionen Menschen, von denen bei wenigstens 10 Millionen eine Herzinsuffizienz angenommen wird (Swedberg et al. 2005). In Deutschland wurde im Jahr 2012 in 40,2 % aller Sterbefälle (absolut 350.000 Fälle) eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems als Ursache angegeben. Damit ist sie die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen durch bösartige Neubildungen. Die Geschlechterverteilung betrug 55,6 % Männer und 44,3 % Frauen. 92 % der Betroffenen waren älter als 65 Jahre (Statistisches Bundesamt 2012). Die Prognose der Herzinsuffizienz ist nach wie vor ernst, 50 % der Erkrankten versterben innerhalb von 5 Jahren (McMurray und Stewart 2000). Die nach wie vor schlechte Prognose und das häufige Auftreten verlangen nach der Suche und Entwicklungen neuer Therapiemaßnahmen.

### 1.1.1 Klinik der Herzinsuffizienz

Eine Herzinsuffizienz liegt vor, wenn das Herz, unabhängig von der Ursache, nicht in der Lage ist, das vom Körper benötigte Herzzeitvolumen zu fördern. Klinisch äußert sich die Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von ihrer Ätiologie in einer verminderten Belastbarkeit, Dyspnoe und Ödem-Neigung. Die Herzinsuffizienz kann je nach Auswirkung und zugrundeliegender Pathologie in eine systolische oder diastolische Herzinsuffizienz sowie in Vor- und Rückwärtsversagen eingeteilt werden. Das Rückwärtsversagen beschreibt einen Zustand, in dem das Herzminutenvolumen ausreichend ist, um die Peripherie mit Sauerstoff zu versorgen, aber durch eine insuffiziente Pumpleistung es nicht zu einem vollständigen Abtransport der Vorlast und damit zu einem Rückstau im kleinen Blutkreislauf kommt. Im Gegensatz dazu beschreibt das Vorwärtsversagen einen Zustand, in dem das Herzminutenvolumen nicht ausreichend ist, um die Peripherie mit Sauerstoff zu versorgen. Eine Kombination aus Vor- und Rückwärtsversagen ist als Globalherzinsuffizienz definiert (Böhm et al. 2009). Die Entstehung der Herzinsuffizienz wird durch koronare Herzerkrankungen, Hypertonie, Kardiomyopathien und Klappenvitien begünstigt (McMurray und Stewart 2000). Die verschiedenen Ursachen führen zu einer Veränderung der Herzphysiologie und enden mit dem Versuch, durch Adaptationsmechanismen, besonders durch neurohumorale Aktivierung, die Versorgung des Organismus zu gewährleisten. Bei dem Versuch der chronischen Kompensation kommt es durch

die neurohumorale Aktivierung zu einer Zunahme der Belastung des Myokards mit Hypertrophie und Fibrose und einer Abnahme der  $\beta$ -Adrenozeptordichte, was wiederum das Herzzeitvolumen verringert und einen *circulus vitiosus* entstehen lässt (Bristow et al. 1982, El-Armouche und Eschenhagen 2009). Die aktuellen Therapien der Herzinsuffizienz zielen auf die Prävention der Entstehung des *circulus vitiosus*, indem Medikamente zum Einsatz kommen, die zum einen nachlastsenkend wirken wie Calciumantagonisten und Betablocker oder zum anderen eine kombinierte Senkung der Vor- und Nachlast bewirken wie Diuretika und ACE-Hemmer.

### 1.1.2 Die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade und ihr Einfluss auf die Herzaktivität

Unter Belastung muss für eine suffiziente Versorgung des Organismus die Pumpleistung des Herzens kurzfristig und kalkulierte um bis auf das 5-Fache der Ausgangssituation gesteigert werden können. Die Anpassung erfolgt über das sympathische Nervensystem. Die sympathische Aktivierung erfolgt über die Bindung von Adrenalin und Noradrenalin an die in den Herzmuskelzellen exprimierten  $\beta$ -Adrenozeptoren. Dies führt zu einer Zunahme der Kontraktion und des Herzzeitvolumens mit einer gesteigerten Auswurfleistung (Brodde 1993). Die Stimulation der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren wirkt positiv chronotrop (Zunahme der Schlagfrequenz des Herzens), dromotrop (Zunahme der Erregungsleitung des Erregungsleitungssystems des Herzens), inotrop (Zunahme der Kontraktionskraft des Myokards) und lusitrop (Zunahme der Relaxation des Myokards). Die Effekte werden über die an die  $\beta$ -Adrenozeptoren gekoppelten G-Proteine weitergeleitet. Die Stimulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptors führt zu einer Disseminierung der stimulierenden  $G_\alpha$ -Untereinheit. Die stimulierenden Einflüsse der  $G_\alpha$ -Untereinheit ( $G_s$ ) führen zu einer vermehrten Aktivität der membranständigen Adenylcyclase (AC), welches zu einer Zunahme der intrazellulären cAMP-Spiegel führt. Die durch cAMP aktivierte Proteinkinase A (PKA) verändert die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die Aufnahme des  $Ca^{2+}$  in das SR (sarkoplasmatisches Retikulum) sowie die  $Ca^{2+}$  Sensitivität der Myofilamentproteine in der Herzmuskelzelle (Brodde 1993, El-Armouche und Eschenhagen 2009, Lohse et al. 2003). Die Regulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade findet auf zwei Ebenen statt. Zum einen durch eine Kontrolle der für die Regulation der Herzaktion wichtigen cAMP-Spiegel durch Phosphodiesterasen, zum anderen durch Phosphatasen, die Effektor-Proteine der PKA dephosphorilieren. Die Feinregulation der cAMP-Spiegel durch Phosphodiesterasen erfolgt durch eine Spaltung der zyklischen 3',5'-Phosphatgruppen des cAMP und/oder cGMP, wodurch das inaktive lineare 5'-Nukleotid entsteht.

### 1.1.3 Störung der $\beta$ -adrenergen Signalkaskade

Im Verlauf einer Herzinsuffizienz kommt es, unabhängig von der Ätiologie, durch eine Aktivierung des Sympathikus zu einer vermehrten Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin. Die Bindung dieser Katecholamine an  $\beta$ -Adrenozeptoren hat eine Zunahme der Herzfrequenz mit einer gesteigerten Relaxation- und Kontraktionsfähigkeit zur Folge (Böhm et al. 2009). Die Bindung von Noradrenalin an  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR führt zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), dieses führt zu einer vermehrten Bildung von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP). Der intrazelluläre Anstieg des cAMPs führt zu einer gesteigerten Aktivität der Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung verschiedener Regulator-Proteine zu einer Zunahme der Herzleistung führt. Die Regulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade findet auf zwei Ebenen statt. Zum einen durch eine Kontrolle der cAMP-Spiegel durch Phosphodiesterasen, zum anderen durch Phosphatasen, die die Effektor-Proteine der PKA dephosphorylieren. Patienten mit Herzinsuffizienz haben unabhängig vom Grund der Erkrankung erhöhte Plasma-Katecholaminspiegel und daraus resultierend eine Daueraktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade. Die dauerhafte Stimulation durch Katecholamine im Rahmen der Herzinsuffizienz führt zu einer kompensatorischen Desensitivierung, vermittelt durch eine verminderte Expression von  $\beta_1$ - Adrenozeptoren (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Die verminderte Expression von  $\beta_1$ - Adrenozeptoren und die damit verbundene kompensatorische Desensitivierung gegen katecholaminerge Stimulation schützt das Myokard kurzfristig gegen Hypertrophie und Fibrosierung, verursacht durch veränderte Genexpression und eine daraus resultierende Zunahme der Proteinsynthese. Auf lange Sicht hin entwickelt sich durch die Veränderung der Rezeptorexpression und der geänderten Hämodynamik eine Herzinsuffizienz.

### 1.1.4 cAMP- und cGMP-Signalweg

Die Anpassung des menschlichen Organismus an Stresssituationen und die Regulation der mehr als 100.000 Kontraktionen und Relaxationen des Myokards in 24 Stunden wird durch die zyklischen 3',5'-Monophosphate cAMP und cGMP und ihre Effektorproteine der Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase B (PKB) vermittelt (Zhang und Kass 2011). Der sekundäre Botenstoff cAMP wird durch die membrangebundene Adenylylcyclase aus Adenosintriphosphat (ATP) nach Stimulierung des  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR gebildet. Die sich anschließende Aktivierung der PKA und die Phosphorylierung der Regulationsproteine gehen mit einer Zunahme der Kontraktion und der Herzfrequenz einher. Die Synthese von cGMP aus GTP wird durch zwei Enzyme katalysiert, durch die direkt durch NO aktivierbare, zytoplasmatische Form der Guanylylcyclase (sGC) und durch die membrangebundene Form der Guanylylcyclase (GC-A). Die GC-A wird durch die Bindung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) und dem B-Typ natriuretischem Peptid (BNP) aktiviert (Kojda et al. 1996, Zhang et al. 2005). Die cGMP-



abhängige Aktivierung der PKG, führt zu einer Aktivierung verschiedener Effektorproteine, wie Phospholamban (PLB), Vasodilatation-stimulierendes Phosphoprotein (VASP), L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und weiteren (Tsai und Kass 2009). Die beiden Signalwege beeinflussen die Herzaktivität gegensätzlich (Shah und MacCarthy 2000). Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass höhere Spiegel an cGMP im Myokard die durch cAMP vermittelten negativen Einflüsse der  $\beta$ -AR-Überstimulation positiv beeinflussen können (Mika et al. 2012, Pokreisz et al. 2009, Stangherlin et al. 2011, Mehel et al. 2013). Die verschiedenen Affinitäten sowie die aktivierenden und inhibitorischen Einflüsse von cAMP und cGMP auf die unterschiedlichen PDE-Isoenzyme sind in Tabelle 1 dargestellt.

### 1.1.5 Phosphodiesterasen-Superfamilie

Der Einfluss des Botenstoffes cAMP und seine essentielle Rolle in der Zunahme der Isotropie nach Stimulation durch Katecholamine wurde bereits 1965 beschrieben (Robinson et al. 1965). Dennoch bleibt die Feinmodulation bis heute Bestandteil intensiver Forschung (Levy 2013). Phosphodiesterasen sind Enzyme, die durch Degradation die Spiegel der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP regulieren. Bis heute sind 21 verschiedene Gene bekannt, die für 12 PDE-Isoenzyme kodieren (PDE1-12). Von den 12 PDE-Isoenzymen sind weitere 48 Splicevarianten bekannt (Bender und Beavo 2006). Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der verschiedenen PDEs erfolgt auf Grundlage von Beavo (Beavo et al. 1994) und soll am Beispiel von PDE2A3 dargestellt werden. PDE steht für eine 3',5'-Zyklonukleotid-Phosphodiesterase. Durch die arabische Ziffer 2 wird die Zugehörigkeit zu der Isoenzym-Familie beschrieben, der Buchstabe A beschreibt das Gen in der Reihenfolge, in der es in der GenBank hinterlegt wurde. Abschließend wird mit der Ziffer 3 die Splicevariante beschrieben (Bender und Beavo 2006). Die verschiedenen Mitglieder der PDE-Superfamilie unterscheiden sich in ihrer Struktur, den kinetischen Eigenschaften, der zellulären Expression, der intrazellulären Lokalisation und der Substrataffinität sowie ihren katalytischen Eigenschaften (Bender und Beavo 2006).

Tabelle 1: Übersicht der PDE-Enzymfamilie

PDE Isoenzym	GAF-Domäne	Substrate	Km ( $\mu\text{M}$ ), cAMP	Km ( $\mu\text{M}$ ), cGMP	Gewebe
1	Nein	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin stimuliert	1–30	3	Herz, Hirn, Lunge, glatte Muskulatur
2	Ja	cGMP-stimuliert	50	50	Herz, Lunge, Leber
3	Nein	cGMP-inhibiert, cAMP-selektive	0,2	0,3	Herz, Lunge, Leber, Fettzellen
4	Nein	cAMP-spezifisch	4	–	Sertolizellen, Niere, Hirn, Leber, Lunge
5	Ja	cGMP-spezifisch	150	1	Lunge, glatte Muskulatur der Gefäße, Herz
6	Ja	cGMP-spezifisch	–	60	Fotorezeptoren
7	Nein	cAMP-spezifisch,	0,2	–	quergestreifte Muskulatur, Herz, Niere, Hirn, Pankreas
8	Nein	cAMP-selektive	0,06	–	Hoden, Auge, Leber, quergestreifte Muskulatur, Herz, Nieren, Ovarien, Hirn
9	Nein	cGMP-spezifisch	–	0,17	Nieren, Leber, Lungen, Hirn, fraglich im Herzen
10	Ja	cGMP-sensitive, cAMP-selektive	0,05	3,0	Hoden, Gehirn
11	Ja	cGMP-sensitive, dualspezifisch	0,7	0,6	quergestreifte Muskulatur, Hoden, Leber, Nieren

Tabellarische Darstellung der PDE-Isoenzymfamilien mit Informationen über GAF-Domänen, Substratspezifität und Hydrolyseaktivität sowie ihre Expression in den verschiedenen Geweben. (Kass et al. 2007).

### 1.1.6 Phosphodiesterasen in Herzmuskelzellen

Es konnte eine Expression in Herzmuskelzellen von 7 PDE-Familien nachgewiesen werden: PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE5, PDE8 und PDE9 (Loughney et al. 1996, Meacci et al. 1992, Kostic et al. 1997, Soderling et al. 1998, Onody et al. 2003, Senzaki et al. 2001). Sowohl cAMP als auch cGMP werden von den drei Dual-spezifischen PDEs, PDE1, PDE2 und PDE3 hydrolysiert, ausschließlich cAMP wird von PDE4 und PDE8 sowie ausschließlich cGMP durch PDE5 und PDE9 hydrolysiert (Zaccolo und Movsesian 2007).

### 1.1.7 Phosphodiesterase 2 (PDE2)

Die cGMP-stimulierbare Phosphodiesterase 2 ist ein Homodimer aus zwei jeweils speziesabhängig 103-105 kDa großen Untereinheiten und wurde erstmals aus Rattenleber extrahiert und als cGMP-stimulierbare Phosphodiesterase durch Beavo et al. 1970 beschrieben. Das PDE2-Protein wurde in kardialen Gewebe mehrerer Spezies, unter anderem in der Ratte, der Maus und in dem Menschen nachgewiesen (Sadhu et al. 1999). Die PDE2 hydrolysiert sowohl cGMP als auch cAMP mit ähnlichen maximalen Raten und relativ hohen  $K_m$ -Werten. Die  $K_m$ -Werte für cAMP betragen basal 30  $\mu$ M und für cGMP 10  $\mu$ M (Zaccolo und Movsesian 2007). Die Bindung von cGMP führt zu einer Steigerung der Hydrolyseaktivität, besonders für cAMP (Martinez et al. 2002).

Das PDE2-Protein wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen: im Herzen, der Leber, der Nebenniere, im Gehirn, in den Endothelzellen und Makrophagen (Martins et al. 1982, Bender und Beavo 2006). Aus dem PDE2-kodierenden Gen sind drei verschiedene Spleißvarianten der PDE2 bekannt: PDE2A1 (Sonnenburg und Beavo 1991), PDE2A2 (Yang et al. 1994), PDE2A3 (Sadhu et al. 1999). Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur nur in den N-terminalen Aminosäuren. Es wird davon ausgegangen, dass das N-terminale Ende für die intrazelluläre Lokalisation verantwortlich ist (Rosman et al. 1997). Es sind keine Unterschiede in der Kinetik der einzelnen PDE2-Varianten bekannt. PDE2A1 ist im Zytoplasma lokalisiert, PDE2A2 und PDE2A3 sind membrangebunden (Bender und Beavo 2006, Sadhu et al. 1999).

Von den 11 bekannten Phosphodiesterasen besitzen fünf GAF-Domänen, von denen wiederum drei cGMP binden können (Aravind und Ponting 1997). Das 941 Aminosäure große menschliche PDE2-Monomer ist in vier Domänen organisiert: Der N-Terminus (1-214), GAF-A (215-372), GAF-B (393-541) und die katalytische Domäne (579-941) (Martins et al. 1982). Die Anordnung der Domänen ist linear, die Verbindungen der Domänen sind über  $\alpha$ -Helices organisiert. In der Homodimer-Form stehen sich die GAF-A-Domänen der beiden Monomere sowie die GAF-B-Domänen gegenüber (Pandit et al. 2009). Über die GAF-A-Domäne findet die Bindung zum Homodimer statt, die GAF-B-Domäne dient cGMP als Bindungsstelle (Martinez et al. 2002). Bindet cGMP an die GAF-A-Domäne, erfolgt eine Konformationsänderung an der katalytischen

Domäne und es kommt zu einer Zunahme der Hydrolyse für cAMP um das 5- bis 30-Fache. Diese Änderung der Affinität tritt auch unter physiologischen Konzentrationen von cAMP und cGMP auf (Manganiello et al. 1990).

Die Phosphodiesterase 2 spielt eine zentrale Rolle im cAMP- und cGMP-Signalweg. Ihre einmalige Funktion, durch die allosterische Bindung von cGMP eine Erhöhung der katalytischen Aktivität um das 5- bis 30-Fache für cAMP zu haben, ermöglicht der PDE2 einen negativen *Crosstalk* zwischen den beiden Signalwegen (vergl. Abbildung 1) (Francis et al. 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch eine Stimulation der PDE2 mit cGMP die lokalen cAMP-Spiegel des L-Typs  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals gesenkt werden und somit den auf Grund von  $\beta$ -AR und /oder cAMP-Stimulus erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) des L-Typs  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals stark antagonisieren können (Hartzell und Fischmeister 1986, Mery et al. 1995). Im menschlichen Myokard wurden mit Hilfe des selektiven PDE2-Inhibitors EHNA (erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin) die regulatorischen Einflüsse der PDE2 auf den basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom untersucht (Rivet-Bastide et al. 1997). In neonatalen Kardiomyozyten konnte der abschwächende Effekt auf die beta-adrenerg hervorgerufene Inotropie des Herzens der PDE2 auf die cAMP-abhängige PKA und damit ein antagonistischer Effekt über den  $\beta$ 3-AR/NO/cGMP- Signalweg gezeigt werden (Stangherlin et al. 2011, Mongillo et al. 2006). Diese Funktionen macht die PDE2 zu einem wichtigen und potentiell pharmakologisch modulierbaren Stellglied in der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade.

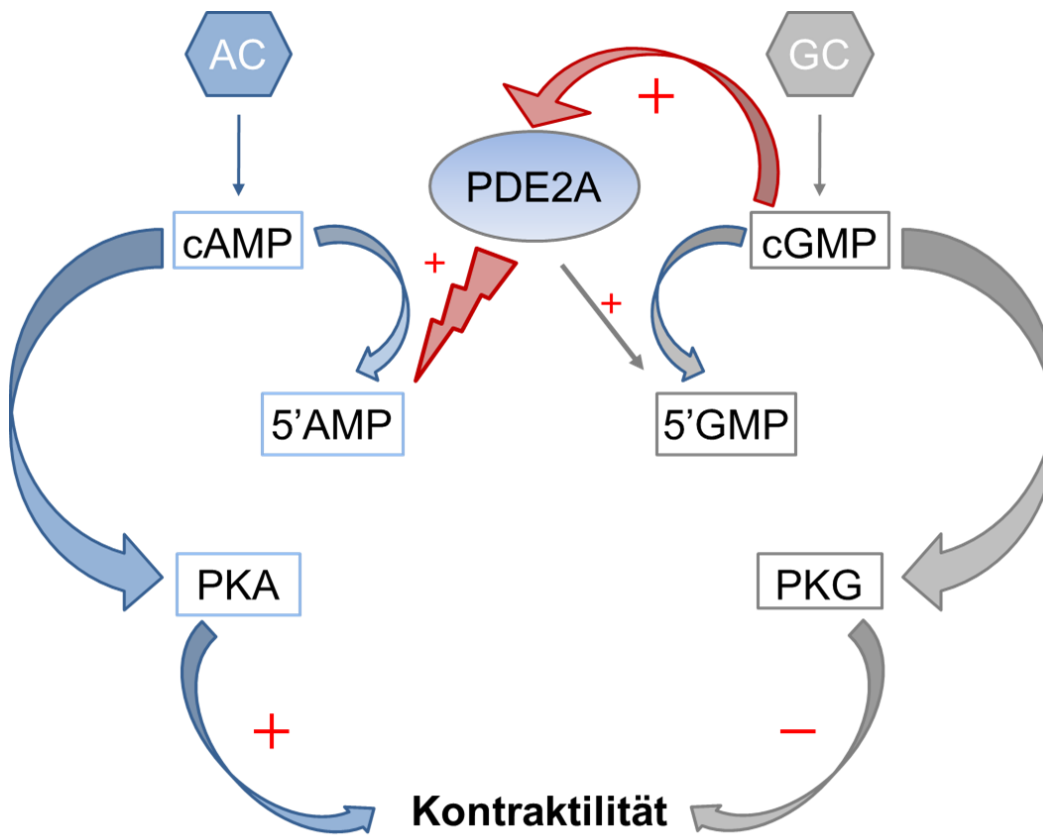


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PDE2 im cAMP- und cGMP-Signalweg

In der schematischen Darstellung ist die zentrale Rolle der PDE2 zwischen dem cAMP- und cGMP-Signalweg dargestellt. Eine Zunahme von cGMP führt zu einer Aktivierung der PDE2 und somit zu einer vermehrten Hydrolyse von cAMP, was wiederum mit einer relaxierenden Wirkung auf das Myokard einhergeht.

## 1.2 Zielsetzung

Die zentrale Rolle der PDE2, in dem an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Herzinsuffizienz beteiligtem cAMP- und cGMP-Signalweg, sowie die Möglichkeit einer Steigerung der Aktivität der PDE2 durch eine Erhöhung der cGMP-Spiegel, machen die PDE2 zu einem potentiell pharmakologisch beeinflussbaren intrazellulären Target. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden sowie die Generierung eines PDE2-Adenovieruses, um in der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz die Expression der PDE2 im erkrankten und gesunden Myokard auf Protein- und RNA-Ebene zu untersuchen, mögliche Ursachen für eine Regulation zu detektieren und so ein besseres Verständnis über die veränderte Aktivität und Expression der PDE2 in der Herzinsuffizienz zu erhalten.

Der überwiegende Anteil der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse und Abbildungen wurde von dem Ersteller der Arbeit als gleichberechtigter Erstautor unter dem Titel *Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts  $\beta$ -Adrenergic Responses in Cardiomyocytes* im *Journal of the American College of Cardiology* veröffentlicht. Abbildung 6 wurde als Koautor in *PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways .* im *Am J Physiol Heart Circ Physiol* veröffentlicht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klonierung

#### 2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue wurden mit folgenden Restriktionsenzymen (Fermentas) durchgeführt: *NotI*, *SaI*, *PmeI*, *PacI* und *BamHI*. Der Standardreaktionsansatz umfasste 2 IU Restriktionsenzym pro µg DNA, 1 µl 10 X Reaktionspuffer und wurde mit *Aqua ad iniectabilia* auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Reaktion wurde der Ansatz für 2 Minuten auf 65 °C erhitzt, um den Verdau zu stoppen.

#### 2.1.2 DNA-Gelaufreinigung

Für die Gelaufreinigung wurden die Reaktionsprodukte aus dem Restriktionsverdau auf ein 0,8 %- Agarose-Gel in 2 cm große Geltaschen geladen. Die Fragmente wurden für 90 Minuten bei 80 V im elektrischen Feld aufgetrennt. Die enthaltende Dann wurde mittels Ethidiumbromid und UV-Strahlung dargestellt. Die Isolation der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Zur Elution der DNA wurden die Gelstücke mit QG-Puffer aufgelöst, die DNA an eine Silica-Säule gebunden und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) eluiert.

#### 2.1.3 Ligation

Die Ligationsreaktionen wurden mit T4-Ligase (New England Biolabs, NEB) unter Verwendung von ATP-haltigem Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Ligation wurde ein Insert/Backbone-Verhältnis von 3:1 gewählt. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl T4-Ligase, 1 µl 10 x Ligasepuffer, 6 µl Insert und 2 µl Backbone-Vektor. Die Ligationszeit war über Nacht

#### 2.1.4 Ansatz von LB-Medium

LB-Medium

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	170 mM

Der Ansatz wurde mit Bidestwasser aufgefüllt und ein pH-Wert von 7,4 mit 0,1 N NaOH eingestellt.

### **2.1.5 Transformation von PDE2A3-Plasmid-DNA in hitzekompetente Bakterien**

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden thermokompetente Bakterien vom DH 10B (Invitrogen) verwendet. Die Transformation erfolgte durch die Hitze-Schock-Methode. Es wurden 100 µl Bakterien auf Eis aufgetaut. In die Lösung wurden vorsichtig 5 µl Ligationsansatz an den Boden des Transformationsgefäßes gegeben, Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz für 45-60 sec bei 42 °C inkubiert, dann kurz auf Eis gekühlt und mit 250 µl 37 °C warmen SOC-Medium vermenget. Der Ansatz wurde im Anschluss für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann je 150 µl auf kanamycinhaltige (60 µg/ml) Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert, um ein optimales Bakterienwachstum zu erreichen.

### **2.1.6 Transformation von PDE2- Plasmid-DNA in elektrokompetente Zellen**

Für die Herstellung des adenoviralen PDE2-Konstruktes (Ad-PDE2/EGFP) wurden 50 µl elektrokompetente *E. coli* vom Typ BJ5183 (Addgene) mit 100 ng Plasmid-DNA auf Eis vermischt. Der Ansatz wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser-Küvette, Biorad) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2.500 V, 200 Ω (Gene Pulser, Biorad). Nach erfolgter Elektroporation wurde dem Ansatz sofort 250 µl 37 °C warmes SOC-Medium (Invitrogen 2 % Tryptone, 0.5 % Hefe-Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 mM Glucose) zugeführt. Nachdem der Ansatz für weiter 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt worden war, wurden jeweils 150 µl Gemisch auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen zum Resistenzgen passenden Antibiotikum ausgestrichen.

### **2.1.7 Animpfen einer Schüttelkultur**

Ausgewählte Bakterienkolonien wurden von den Agarplatten mit sterilen Pipettenspitzen aufgenommen und in 12 ml LB-Medium überführt. Dem Medium wurden je nach im Vektor enthaltendem Resistenzgen 100 µg/ml Kanamycin oder Ampicilin zugesetzt. Der fertige Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C und einer Frequenz von 200 rpm inkubiert.

### **2.1.8 Mini-Plasmidpräparation aus einer Schüttelkultur**

Zur weiteren DNA-Analyse wurde die Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien isoliert. Es wurden 4 ml aus dem Medium-Bakteriengemisch der Tageskultur in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 12.000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der vom Pellet



separierte Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl P1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0, Qiagen) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zugabe von Puffer P2 (200 mM NaOH, 3,5 mM SDS, Qiagen) und Invertieren für 5 min lysiert. Die Lysereaktion wurde durch die Zugabe von Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, Qiagen) durch Neutralisation beendet. Die überflüssigen Reagenzien und Bakterienreste wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14,500 rpm von der DNA-haltigen Lösung getrennt. Der entstandene Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einem anschließenden Waschschritt mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (NanoDrop ND1000, Thermo Scientific) bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass das Absorptionsverhältnis von 260/280 nm bei ca. 1,8 lag. Wobei eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNA Konzentration von 50 µg/ml entsprach. Im Anschluss erfolgte eine Restriktionsanalyse zur Identifikation positiver Klone.

### **2.1.9 Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen**

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen wurden 6 cm Zellkulturschalen verwendet, die zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 60 - 80 % aufwiesen. Die Zellen wurden mit DMEM gespült und mit 100 ml Medium bedeckt. Die zu transfizierende DNA wurde in 150 µl Medium aufgenommen. 10 µl Lipofectamin 3000 (Invitrogen) wurden ebenfalls in 150 µl Medium aufgenommen. Die beiden Ansätze wurden vereint und es folgte ein 20-minütiger Reaktionsschritt, in dem sich das Lipofectamin an die negativ geladene DNA anlagert. Zu dem Kulturmedium wurden tröpfchenweise 300 µl Transfektionsansatz gegeben. Nach ca. 4 - 6 Stunden wurde das Medium gegen FCS-haltiges Kulturmedium ausgetauscht. Die Transfektionseffizienz wurde durch ein positives GFP-Signal ermittelt.

### **2.1.10 Isolation großer Plasmid-DNA-Mengen durch Ionenaustauscher-Säule**

Für die Bereitstellung größerer DNA-Mengen wurden 2,5 ml Bakteriensuspension aus einer zuvor positiv getesteten Tageskultur in einen 500 ml fassenden Kolben mit 250 ml LB-Medium und 100 µg/ml Kanamycin oder Ampicilin gegeben. Der Ansatz wurde für 12 h bei 37 °C und 200 rpm bebrütet. Für die Isolation wurde eine Ionenaustauschersäule verwendet (NucleoBondPC 500, Macherey-Nagel). Die Isolation beruht auf einer alkalischen Bakteriolyse, einer Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule und einer Trennung von genomischer DNA und bakteriellen Bestandteilen. Die Bindung der geladenen Plasmid-DNA erfolgt bei niedrigem pH und geringer Salzkonzentration über die negativ geladenen Phosphatreste an der DNA und den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen der

Säulen. Nach weiteren Waschschrinen wurde die gebundene DNA durch Spülen mit einem hochkonzentrierten Salzpuffer von der Säule gelöst und mit Isopropanol gefällt. Die bestehende Salzverunreinigung wurde durch einen weiteren Waschschrin mit 70 % Ethanol verringert. Die Plasmid-DNA wurde durch einstündige Zentrifugation aus der Lösung extrahiert und getrocknet, um etwaige Ethanolrückstände zu beseitigen. Die Reinheit der in *Aqua ad iniectionabilia* gelösten DNA und die Konzentration wurden photometrisch (NanoDrop ND1000, Thermo Scientific) bestimmt.

## 2.2 Adenovirale Expressionssysteme

Da in dieser Arbeit hauptsächlich mit primären Zellen gearbeitet wurde und diese sich nur unzureichend mit den üblichen Transfektionsmaßnahmen (z. B. durch Kalziumchlorid oder liposomale Transfektion, Lipofectamin 2000) transfizieren lassen, musste ein alternativer Gentransport in die Zelle gewählt werden. Aus diesem Grund wurde auf die von (He et al. 1998) beschriebene Methode des adenoviral vermittelten Gentransfers zurückgegriffen. Bei diesen nach der Methode von (He et al. 1998) generierten Adenoviren handelt es sich um replikationsdefiziente, rekombinante extrachromosomal verbleibende Adenoviren vom Serotyp 5.

### 2.2.1 Klonierung des PDE2-Konstrukts in den pAD-Track CMV- Vektor

Für die Generierung des Ad-PDE2 wurden jeweils 10 ng pAd-Track CMV und pYX-ASC-PDE2A2 (Open Biosystems, BC086800) in einem präparativen Verdau mit den Restriktionsenzymen *SaI*I und *Not*I für 2 h verdaut. Der Reaktionsansatz setzt sich aus 10 ng Plasmid-DNA, je 6 µl *SaI*I und *Not*I (Fermentas) und 1 µl BSA zusammen. Das Volumen wurde mit *Aqua ad iniectionem* auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach 2 h wurden die Enzyme durch Erhitzen auf 65 °C denaturiert, die verdauten DNA-Fragmente in einem 0,8 %-Agarosegel (0,8 % Agarose und 0,4 mg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer: 45 mM Tris-Base, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8) gereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin wurden die DNA-Fragmente mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) extrahiert. Die Ligation erfolgte mittels T4-Ligase, wie in 2.1.3 beschrieben. Das Vektor/Plasmid-Verhältnis betrug 1:4. Im Anschluss wurden die Ligationsprodukte mittels der Hitze-Schock-Methode in Hitze-kompetente *E. coli* des Stammes DH10B (Invitrogen) transformiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurde der Ansatz auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C für 16 h bebrütet. Nach Ablauf einer 16-stündigen Wachstumsphase wurden ausgewählte Bakterienkolonien von den Agarplatten (1,5 % Agarose, 100 µg/ml Kanamycin in LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,4) geerntet. Die selektionierten Kolonien wurden in 12 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium für weitere 16 h bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Die DNA wurde mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen) isoliert. Positive Klone konnten durch Restriktionsanalysen mit *Bam*HI und *Not*I in einem 0,8 %-Agarosegel identifiziert werden.

Ein positiv identifizierter *E. coli* Stamm wurde über Nacht in 250 ml LB-Medium bei 37 °C vermehrt und die Plasmid-DNA wie in 2.1.5 beschrieben isoliert. Die isolierte DNA wurde, um die korrekte Insertion des GOI zu überprüfen, sequenziert (SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen). Der Sequenzierungsprimer wurde so gewählt, dass er in dem Endbereich des pAd-Track-Vektor bindet und in den Anfangsbereich der PDE2-cDNA hereinragt, um zum einen die

stattgefundene Insertion und zum anderen die richtige Ausrichtung der PDE2-cDNA in dem pAd-Track-CMV Vektor zu überprüfen. Durch die Sequenzierung (SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen) konnten 8 positive Klone festgestellt werden.

### **2.2.2 Linearisierung und Aufreinigung des pAd-Track-PDE2-CMV**

Zur Vorbereitung der homologen Rekombination wurde der pAd-Track-PDE2-Transfektor mit dem Restriktionsenzym *PmeI* geschnitten. Die Schnittstelle von *PmeI* teilt den Shuttlevektor in einen linken und rechten Arm und ermöglicht so das Anlagern an das AdEasy-Plasmid. Für die Linearisierung wurden 80 µg Transfektor mit 160 U *PmeI* für 16 h bei 37 °C in einem Orbital-Schüttler inkubiert. Die Linearisierung wurde durch elektrophoretische Auftrennung in 0,8 %-Agarosegel bestätigt. Die so geschnittene DNA wurde wie bei (He et al. 1998) beschrieben mit Glykogen gefällt und aufgereinigt.

### **2.2.3 Homologe Rekombination mit dem Ad-Easy-System**

Für die homologe Rekombination wurde der aufgereinigte und mit *PmeI* linearisierte pAd-PDE2-Track-CMV in elektrokompente BJ5183 AdEasier-Zellen transfiziert. Dazu wurden der linearisierte pAd-Track-PDE2-Vektor und die AdEasier-Zellen in eine gekühlte 2 mm Glasküvette gegeben und mit dem Bio-Rad Genpulser bei 2500 V und 200 Ohm gepulst. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf kanamycinhaltigen Agarplatten. Nach 16 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die kleinsten sichtbaren Kolonien von den Platten gepickt und wiederum in 2 ml kanamycinhaltigem LB-Medium über Nacht in einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde aus jeweils 0,25 ml des LB-Mediums Mini-Präparationen durchgeführt. Die Größe der Klone wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %-Agarosegel überprüft. Positive Klone wurden wie beschrieben in DH10B-Zellen transfiziert. Die korrekte Insertion des GOI in das finale rekombinante adenovirale Plasmid wurde mittels Sequenzierung (SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen) überprüft.

### **2.2.4 Herstellung Rekombinanter Adenoviren in HEK293-Zellen**

Die Vermehrung der rekombinanten Ad-PDE2/GFP-Adenoviren in HEK293 erfolgte nach der bekannten Methode von He (Luo et al. 2007). Kurz zusammengefasst wurden dazu HEK293-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit dem mit *PmeI* linearisiertem Ad-PDE2-Plasmid mit Hilfe von Lipofectamin transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion wurde durch ein positives GFP-Signal überprüft. Nach 7 Tagen wurde täglich unter dem Mikroskop das GFP-Signal und die Zellintaktheit überprüft. Nach 20 Tagen wurden die Viren durch, wie bei He beschrieben (Luo et

al. 2007) geerntet und durch Zentrifugation aufgereinigt und konzentriert. Im Anschluss wurden durch eine Verdünnungsreihe die erreichten Virustiter bestimmt.

### **2.3 Modelle der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz**

Aus dem linken Ventrikel von Patienten wurde Gewebe mit fortgeschrittener dilatativen Kardiomyopathie (DCM) oder fortgeschrittener ischämischer Kardiomyopathie zum Zeitpunkt einer Herztransplantation gewonnen. Die Ejektionsfraktion betrug bei den verwendeten Proben weniger als 37 %. Als Kontrollen wurde Gewebe aus dem linken Ventrikel von gesunden Spendern ohne Herzerkrankung in der Anamnese genommen (NF), deren Organe auf Grund von nicht passenden Empfängern nicht transplantiert wurden. Von Patienten mit symptomatischer Aortenstenose wurde aus dem Septum des linken Ventrikels im Rahmen einer Aortenklappenersatzoperation und Muskelgewebeabtragung Myokard gewonnen. Diese Patienten hatten zum Zeitpunkt der Operation eine signifikante myokardiale Hypertrophie, aber eine noch kompensierte Ejektionsfraktion. Die Verwendung der Gewebe in dieser Arbeit wurde von dem Ethikkomitee der Universität Göttingen geprüft und genehmigt. Die schriftliche Einwilligung aller Studienteilnehmer liegt vor. Die Gewebeproben wurden von Prof. Sossalla aus der Arbeitsgruppe Prof. Meier Klinik für Kardiologie und Pneumologie bereitgestellt. Ethik-Antrag „Funktionelle, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Gewebeproben aus explantierten menschlichen Herzen“ (Antragsnummer: 31/9/00) bereitgestellt. Die klinischen Daten der Spenderpatienten sind in Tabelle 2 aufgelistet, und die verwendete Materialien zusammengefasst.

## **2.4 Chronisches beta-adrenerges Stressmodell in der Ratte**

### **2.4.1 Implantation von osmotischen Mini-Pumpen**

Für eine kontinuierliche Applikation mit Isoproterenol für einen Zeitraum von 5 Tagen, wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 240-300 g mit osmotischen Minipumpen (Alzet Modell 2002) ausgestattet. Um eine Abgaberate von 2,4 mg/kg/d Isoprenalin zu erreichen, wurde jede Pumpe für jedes Tier gewichtsadaptiert mit einem Isoprenalin-0,9 % NaCl und 0,2 mM-HCl Gemisch gefüllt und in NaCl für 12 h inkubiert (El-Armouche et al. 2007a). Die Tiere wurden in einer mit Isofluran vorgefluteten Kammer betäubt und dann mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (1,5 l/h) für wenige Sekunden begast. Die Ratten wurden durch Pflaster auf dem Bauch liegend an den Extremitäten fixiert und die Nackenpartie enthaart. Das enthaarte Gebiet wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert. Durch eine ca. 0,7 cm lange horizontale Inzision wurde die Haut mit einem Nadelhalter getunnelt und in die entstandene Hauttasche die Pumpe vorgeschoben. Die Hautinzision wurde durch 2-3 Klammern (Manipler Einweg Hautklammergerät BRAUN) adaptiert. Zur Nachsorge erhielten die Tiere bis 4 d nach Implantation 125 mg Metamizol auf 1000 ml Trinkwasser. Alle Experimente und Untersuchungen wurden nach den Richtlinien des Europäischen Parlaments durchgeführt (2010/63/EU); Tierversuchsantragsaktenzeichen: 33.14-42502-04-11/0579.

### **2.4.2 Organentnahmen**

Zur Organentnahme wurden die Tiere mittels Isoflurangas in eine Narkose versetzt. Das Körpergewicht wurde bestimmt. Durch zervikale Dislokation wurden die Tiere getötet. Der Thorax und das Abdomen wurden durch einen Schnitt entlang der Medianlinie eröffnet und die Herzen, Lebern sowie die Lungen entnommen. Nach kurzer Spülung in 0,9 % Kochsalzlösung wurden die Einzelgewichte der jeweiligen Organe bestimmt. Das Herz wurde in rechten und linken Ventrikel aufgeteilt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Organe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für die folgenden Versuche bei -80 °C konserviert. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert, wodurch ein homogenes Pulver entstand. Die anschließende Protein-Aufreinigung erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben.

### **2.4.3 Großtiermodell der Herzinsuffizienz in Rapid-Paced-Hunden**

Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. S. Nattal (Montreal, Quebec, Canada) bereitgestellt. Die Herzinsuffizienz wurde wie von Li (Li et al. 1999) beschrieben induziert. Dazu wurde bei Mischlingshunden (Gewicht 22 bis 30 kg) eine Schraubelektrode in den linken

Ventrikel angebracht und mit einem im Nacken implantierten Schrittmacher verbunden. Die Hunde (HF) wurden mit einer Frequenz von 240 Schlägen pro Minute für eine Dauer von 14 Tagen stimuliert. Kontrolltiere (Sham) wurden operiert, aber nicht über die Sonde stimuliert. Die beobachteten haemodynamischen Veränderungen waren typisch für eine Dilatative Kardiomyopathie. Es zeigte sich ein erhöhter enddiastolischer Druck im linken Ventrikel (LVEDP). Die Tiere zeigten eine Tachypnoe, Ascites, Lungenödeme und Pleuraergüsse. Die Herzen wurden während einer Anästhesie mit Morphin (2 mg/kg SC) und  $\alpha$ -Chloralose (120 mg/kg, i.v.) entnommen (El-Armouche et al. 2007b).



## 2.5 RNA-Analysen

### 2.5.1 Isolation von RNA

Zur Isolation der RNA aus Herzgewebe wurden 30 mg gemörseretes und tiefgefrorenes Gewebe nach Herstellerangaben mit dem *SV Total RNA Isolation System Kit* (Promega) verarbeitet. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt (NanoDrop ND1000, Thermo Scientific). Die anschließende Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.5.2 Reverse Transkription

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde nach Herstellerangaben 1000 ng RNA mittels Reverser-Transkriptase mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) umgeschrieben. Die Synthese der cDNA erfolgte gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von Oligo(dt)-Primern mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems). Um Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde von jeder Probe eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase angefertigt. Die cDNA wurde bei -20 °C weggefroren.

### 2.5.3 Real-Time PCR

Die quantitativen Messungen der Transkripte von kardialer PDE2, GAPDH und ANP erfolgte aus Homogenaten aus dem linken Ventrikel. Die RNA wurde, wie in Punkt 2.5.1 beschrieben, aus ~30 mg gefrorenem Myokard isoliert. Mittels Real- Time PCR (SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Fermentas) und den folgenden Primer Paaren:

ANP: 5`GTGCGGTGTCCAACACAG, 5`GCTTCATCGGTCTGCTCGCTCA;

PDE2: 5`AGTGCTGGGAGAAGAGGTCA, 5`TCATCAGTCGAGCCACTGAC; und

GAPDH:5`ATGTTCCAGTATGACTCTACCCACG,5`TGTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTTC und wurden mit dem ABI PRISM 7900HT System (Applied Biosystems) die relative Menge der PDE2-, GAPDH- und ANP-mRNA-Transkripte bestimmt.

## 2.6 Proteinanalytische Methoden

### 2.6.1 Proteingewinnung aus Gewebe für Immunoblot-Analysen

Für die Isolation aus Gewebe wurden 30 mg pulverisiertes Herzgewebe gewogen. Die gesamte Extraktion wurde auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe des zehnfachen Volumens des Gewichts an Lysispuffers (3 % SDS, 30 mM Tris Base, pH 8,8 5mM EDTA, 30 mM NaF, 10 % Glycerol) wurden die Proben für 3\* 30 Sekunden (20 Hz, -20°C) im *TissueLyzer II* (Qiagen) homogenisiert. Anschließend folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 rcf bei Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge 5417R), um das gewonnene Homogenat von groben Gewebeteilen zu reinigen. Mit dem Überstand wurden eine Proteinbestimmung (2.6.2) und anschließende immunologische Nachweise von Protein (2.6.3) durchgeführt.

### 2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einem Farbumschlag einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung, in Abhängigkeit von der in der Probe enthaltenen Proteinmenge. Es wurde hierzu Nanoquant der Firma Roth verwendet. Die Interaktion von Protein mit dem Farbstoff löst eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm aus. Um eine absolute Proteinbestimmung aus der gemessenen Absorption durchführen zu können, wurde mittels Bovine Immunoglobulin G (Sigma-Aldrich) eine Standardreihe von 0-1020 µg/ml in 85 µg/ml Schritten hergestellt. Aus den verschiedenen Konzentrationen wurde eine Standardkurve angefertigt und in das Photometer eingelesen. Anhand der Standardkurve wurden die mit 0,1 % NaOH verdünnten Proben gemessen. Die Verdünnung diente dem Zweck, dass die zu bestimmenden Proteinkonzentrationen im linearen Bereich der gemessenen Standardkurve lagen. Für jeden Standard und für jede Probe wurden Doppelmessungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

### 2.6.3 Bestimmung der Proteinexpression

#### 2.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde den Proben das 6-Fache an Probenpuffer (2% SDS, 10 % Glycerol, 10 mM Tris-Base, pH 6,8, 100 mM DTT und 0,01 % Bromphenolblau) zugesetzt. Die Lysate wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Für die Gelelektrophorese wurde in Abhängigkeit des Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins 8-15 % Polyacrylamid-Gele (Trenngel: 375 mM Tris-Base, pH 8,8, 10-15 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 29:1, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,03 % TEMED; Sammelgel: 125 mM Tris-Base, pH 6,8, 5 % Acrylamid/Bis-Acrylamid-

Lösung: 29:1, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED) verwendet. Die anschließende Gelelektrophorese wurde in einem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) in dem Mini Protean 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad) bei 80 V für 15 Minuten und anschließend bei 120 V für weitere 60 bis 120 Minuten durchgeführt. Als Standard wurde der Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad) mitgeführt.

### 2.6.3.2 Western Blot

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose (Protan® BA 85, Schleicher und Schuell) oder PVDF-Membran 0,45 µm (Hybond-P PVDF, Amersham-Pharmacia), erfolgte in dem Mini Trans-Blot Cell System (Bio-Rad). Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurden bei konstant 400 mA in Transferpuffer I (50 mM Tris-Base, 380 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) die Proteine auf die Membran geblotted. Im Anschluss wurden die Proteine durch Ponceau-S-Lösung (0,1 m/v Ponceau-S, 1 % v/v Eisessig) sichtbar gemacht, um so den korrekten Transfer und eine gleichmäßige Beladung feststellen zu können. Nach Entfärbung mit TBST Puffer (100 mM Tris-Base, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) wurden die Membranen in 5 % Milchpulver-Lösung geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

Die anschließende Inkubationszeit mit dem primären Antikörper variierte zwischen einer und 12 Stunden bei 4 °C. Nach Bindung des primären Antikörpers wurden die Membranen über 25 Minuten mit 4-maligen Wechseln der TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit dem vom 1. AK abhängigen HRPO-konjugierten sekundären Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen wie beschrieben für 10 Minuten gewaschen, um nichtgebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit ECL-Substrat (Enhanced Chemiluminescence, Pierce) und mit Hilfe des VersaDoc Imaging System 4000 MP (Bio-Rad). Die anschließende Quantifizierung erfolgte mit der Quantity One Software (Bio-Rad).

## 2.7 PDE2-Aktivitäts-Assay

Die Messungen der Aktivität der PDE2 wurden durch Frau Dr. Mehel am *French institute of Health and Medical Research* in Paris durchgeführt. Mit Hilfe der Methode von Thompson und Appleman (Thompson und Appleman 1971) wurde die Degradierung von cyclischem AMP und cyclischem GMP bestimmt. Die cAMP-hydrolytische Aktivität wurde mit 1  $\mu\text{M}$  cAMP and  $10^5$  cpm  $^3\text{H}$ -cAMP und die cGMP-hydrolytische Aktivität mittels 5  $\mu\text{M}$  cGMP und  $10^5$  cpm  $^3\text{H}$ -cGMP bestimmt. Die Aktivität der PDE2 wurde als diejenige Fraktion der cAMP/cGMP Aktivität definiert, die durch den hoch spezifischen PDE2-Inhibitor BAY 60-7550 (100 nM) inhibiert wurde.

## 2.8 Bestimmung der zellulären Hypertrophie

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden 24 Stunden nach der Infektion mit Ad-GFP oder Ad-GFP-PDE2 mit einer MOI von 100 mit 10  $\mu$ M Norepinephrin (NOR) oder 10  $\mu$ M Phenylephrin für weitere 24 Stunden in Serum-freiem MEM inkubiert. Mit Hilfe einer Kamera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany) in Verbindung mit einem 20x Objektiv eines Nikon TE 300 Mikroskops bei einer Wellenlänge von 488 nm wurden GFP-positive Zellen beider Modalitäten abgelichtet. Die Messung der Zelloberfläche der einzelnen Zellen wurde mit der Image J Software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) durchgeführt. Die Experimente zur Messung der Zelloberflächen wurden mit den Kollaborationspartnern am *French institute of Health and Medical Research*, Paris durchgeführt.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die Daten in dieser Arbeit werden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Proben ist mit n angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student-t-Test errechnet. Die Berechnungen der Signifikanzen erfolgte mit der *Prism 4 Software* (GraphPad). p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung des rekombinanten PDE2-Adenovirus

##### 3.1.1 Klonierung des pAdTrack-PDE2-CMV Shuttle-Vektors

Zur Untersuchung der Auswirkung einer PDE2-Überexpression sowie der intrazellulären Lokalisation in Primärzellen wurde ein PDE2-Adenovirus nach der Methode von He et al. (He et al 1998, Luo et al. 2007) generiert. Dafür wurde die PDE2-cDNA aus dem pYX-ASC-PDE2A2-Vektor (Open Biosystems, BC086800) in den pAdTrack-CMV-Vektor, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, kloniert. Die erfolgreiche Insertion wurde durch eine Transfektion in HEK-Zellen im Immunoblot überprüft.

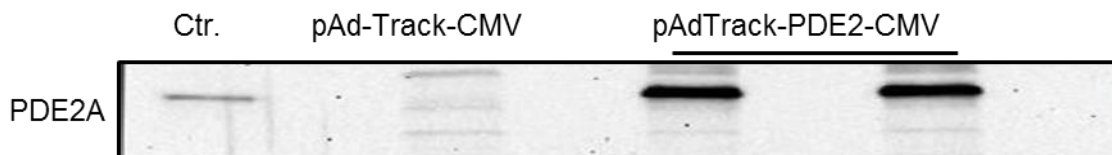


Abbildung 2: Generierung des PDE2-pAD-Track-CMV.

Auf der Membran ist der Proteinnachweis mittels anti-PDE2 Antikörper in Lysaten von mit pAdTrack-CMV und pAdTrack-PDE2-CMV transfizierten HEK293 - Zellen dargestellt. Die mit dem PDE2-pAd-Track-CMV transfizierten Zellen generieren eine Bande bei ca. 100 kDa. Die Transfektion mit dem leeren Backbone-Vektor pAd-Track-CMV liefert kein Signal. Als Kontrolle wurde murines Hirnlysat mitgeführt.

### 3.1.2 Homologe Rekombination von pAd-Track-PDE2-CMV und pAdEasy

Zur Vorbereitung der homologen Rekombination wurde der pAd-Track-PDE2-CMV Transfervektor mit dem Restriktionsenzym *PmeI* geschnitten. Die Schnittstelle von *PmeI* teilt den pAd-Track-PDE2-CMV Shuttlevektor in einen linken und rechten Arm. Die positiven Klone wurden durch Restriktion mit *PacI* identifiziert. Die erfolgreiche Rekombination zeigt sich durch ein ca 33,4 kb DNA- Fragment sowie einem dazugehörigen 4,5 kb großen Fragment.

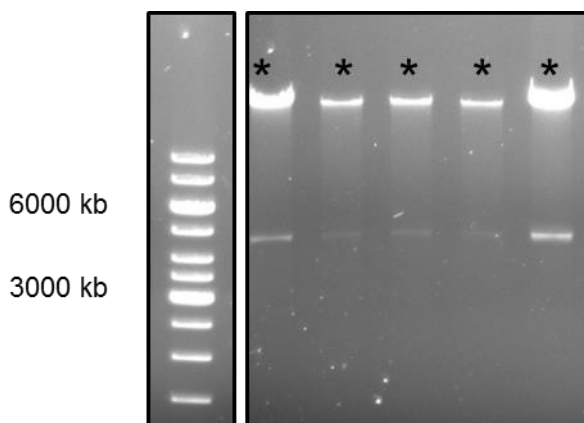


Abbildung 3: Verdau von pAd-Easy-PDE2A3 nach der homologen Rekombination

Bei einer erfolgreichen homologen Rekombination zeigen sich DNA-Fragmente in einer Größe von 4,5 kb sowie 33 kb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Die mit \* gekennzeichneten Spuren zeigen positive Klone

Die korrekte Insertion des GOI in das finale rekombinante adenovirale Plasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Replikation der Viren fand wie in den Methoden beschrieben in HEK293-Zellen statt.



### 3.1.3 Viral überexprimierte PDE2 in neonatalen Rattenherzmuskelzellen

Die erfolgreiche Transfektion von Zellen mit dem pAd-PDE2/GFP-Virus und die daraus resultierende PDE2-Expression, wurden in neonatalen Rattenherzmuskelzellen getestet. Dafür wurden kultivierte neonatale Rattenherzmuskelzellen mit aufsteigenden Viruskonzentrationen infiziert. Die *Multiplicity of infection* (MOI) betrug 0, 100, 300. Die Immunofluoreszenzfärbung der Rattenherzmuskelzellen zeigt die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt, der anti-PDE2-AK mit rot und ein grünes Signal für GFP. Hierbei zeigt sich eine deutliche Intensitätszunahme der Anti-PDE2-Immunofluoreszenzfärbung in den mit aufsteigenden MOI transfizierten Zellfraktionen.

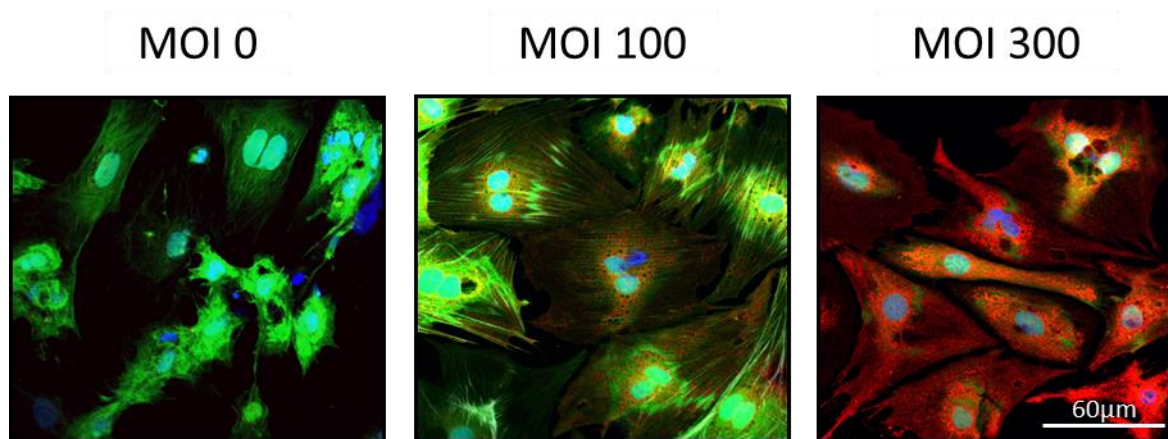


Abbildung 4: Ad-PDE2- infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten

Die Abbildung zeigt neonatale Rattenkardiomyozyten transfiziert mit aufsteigenden Viruskonzentrationen. Blau = DAPI, grün = GFP, rot = PDE2. Eine steigende MOI geht mit einer vermehrten PDE2-Expression einher.

### 3.2 Spezifität des PDE2-Antikörpers

Da im Rahmen von Vorversuchen eine wechselnde und schlechte Spezifität der verschiedenen kommerziell erhältlichen Antikörper festgestellt wurde, wurde zur Prüfung der Spezifität des für diese Arbeit verwendeten PDE2-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology Klon: PDE2 sc20) HEK293-Zellen mit den Adenoviren pAd-Track-EGFP, pAd-PDE2-HA und pAd-PDE2 transfiziert. Als Kontrolle wurde murines Hirnlysate, mit aus der Literatur bekanntem hohem Level (Repaske et al. 1993) an PDE2, im Western Blot mitgeführt. Die geblottete Nitrocellulosemembran (*Protran*<sup>®</sup> BA 85, Schleicher und Schuell) wurde im ersten Schritt mit einem anti-PDE2-Antikörper inkubiert, danach gestrippt und mit einem anti-HA-Antikörper reinkubiert. Das Verteilungsmuster der detektierten Banden zeigt die Spezifität des verwendeten Antikörpers.

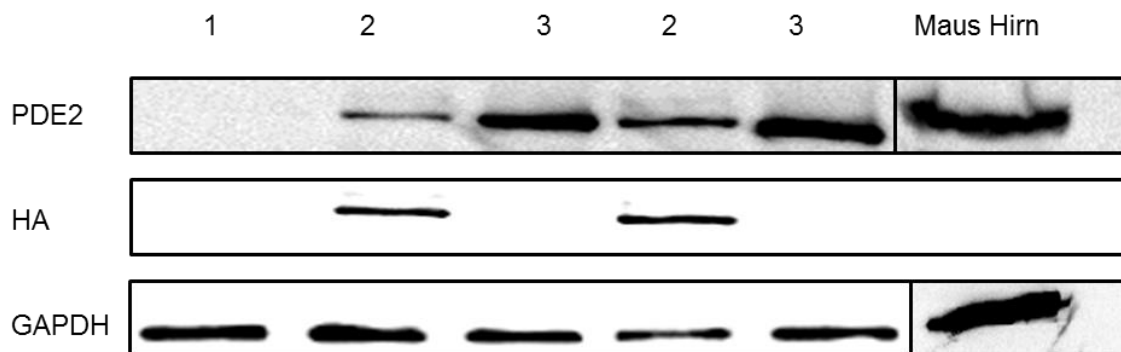


Abbildung 5: Spezifität des PDE2-Antikörpers

Die Spezifität des kommerziell erhältlichen PDE2- Antikörpers wurde mittels Zelllysaten aus HEK293-Zellen überprüft. Dafür wurden die Zellen mit pAd-Track-EGFP =1, pAd-Track-PDE2-HA =2 und pAd-Track-PDE2 =3 transfiziert. Als weitere Kontrolle wurde auf derselben Blotmembran murines Hirnlysate mit bekanntem hohem PDE2-Gehalt mitgeführt. Der Nachweis wurde mittels anti-PDE2, anti-HA und zur Ladungskontrolle anti-GAPDH durchgeführt.

### 3.3 Endogene PDE2-Expression in kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten

PDE2 wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen: Unter anderem im Herzen, der Leber, der Nebenniere, im Gehirn, in Endothelzellen und Makrophagen (Martins et al. 1982, Bender und Beavo 2006). Auf zellulärer Ebene, besonders im Myokard, ist über die PDE2-Expression und mögliche Unterschiede zwischen den Zelltypen wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden kultivierte neonatale Maus-Kardiofibroblasten (CF) und Kardiomyozyten (CM) auf ihre endogene PDE2-Expression untersucht. Um die Reinheit der Fraktionierung der beiden Zellpopulationen nach mehrmaligem Gefrieren und Auftauen überprüfen zu können, wurden zusätzlich Pro-Kollagen als Fibroblasten-spezifischer und Calsequestrin als Kardiomyozyten-spezifischer Marker bestimmt. Die Proteinanalysen zeigten eine ca. 2,5-Fach höhere PDE2-Expression in den kardialen Fibroblasten im Vergleich zu den Kardiomyozyten.

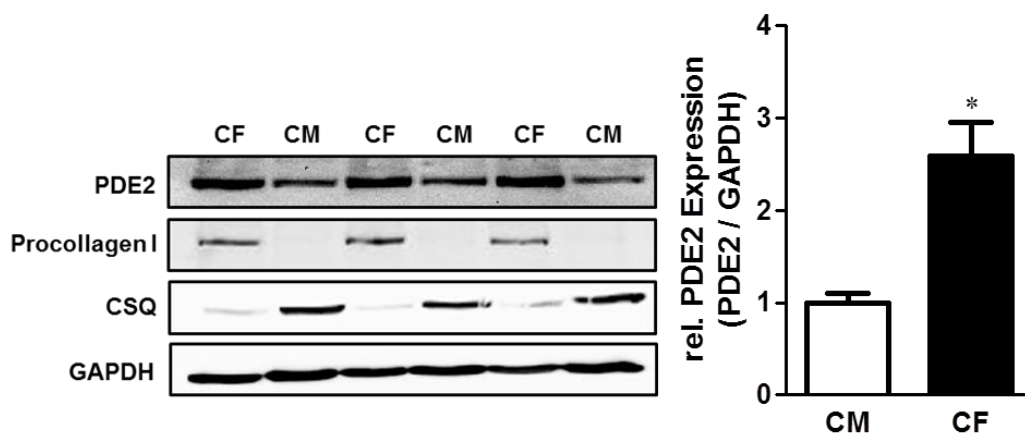


Abbildung 6: Endogene Expression der PDE2 in neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Gezeigt sind repräsentative Immunoblots von neonatalen Ratten-Kardiofibroblasten (CF) und Kardiomyozyten (CM). Als Markerprotein für Kardiomyozyten wurde Calsequestrin (CSQ, 52 kDa), für Fibroblasten Pro-Kollagen 1 (230 kDa) verwendet. Der Graph zeigt die Quantifizierung der relativen Expression von PDE2 normalisiert auf GAPDH (37 kDa). n=5, \* $p \leq 0,05$  vs. CM. (Vettel et al 2014)

### 3.4 PDE2-Expression in der menschlichen Herzinsuffizienz

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass die Proteinexpression der PDE2 im Rahmen der Herzinsuffizienz beim Menschen reguliert ist. Die PDE2-Expression im Myokard ist bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz erhöht. Zur Analyse der PDE2-Spiegel im Myokard des linken Ventrikels von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz (Ejektionsfraktion  $\leq 37\%$ ) wurden Herz-Homogenate von erkrankten Patienten mit gesunden Spenderherzen verglichen ( $n = 6$ ). Jede Probe wurde auf Calsequestrin (CSQ) normalisiert. Es zeigte sich eine Erhöhung der PDE2-Expression um das  $\sim 2$ -Fache in den von einer dilatativen Kardiomyopathie ( $n=5$ ) oder ischämischen Kardiomyopathie ( $n=5$ ) betroffenen Patienten. Die klinischen Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 dargestellt. (Mehel et al. 2013)

#### 3.4.1 Klinische Daten der Spenderpatienten

Tabelle 2: Patienten-Charakteristika

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Medikation	NYHA	CI	LVEF
1	28	M	NF	n.d.			n.d.
2	34	M	NF	n.d.			n.d.
3	20	M	NF	n.d.			n.d.
4	23	F	NF	n.d.			n.d.
5	n.d.	F	NF	n.d.			n.d.
6	58	M	ICM	ACDOX	3-4	1,9	19 %
7	57	F	ICM	ACDX	n.d.	n.d.	23 %
8	40	M	ICM	ACDX	n.d.	2,5	20 %
9	48	F	ICM	ACDGX	3	2,0	25 %
10	66	M	ICM	AGDX	3-4	2,4	25 %
11	43	M	ICM	n.d.	n.d.	n.d.	23 %
12	57	M	ICM	ADG	4	-	15 %
13	64	M	ICM	ADNO	4	3,9	15 %

## Ergebnisse

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Medikation	NYHA	CI	LVEF
14	49	M	ICM	ADROS	4	2,1	15 %
15	46	M	ICM	DO	3	2,2	20 %
16	55	M	ICM	RD	-	1,7	20 %
17	52	F	ICM	ADRC	3-4	1,7	25 %
18	53	M	DCM	DRX	3	5,7	37 %
19	31	F	DCM	ACDX	3	n.d	34 %
20	47	M	DCM	n.d.	3-4	2,1	28 %
21	55	M	DCM	ADGO	3	3,5	20 %
22	50	M	DCM	DRGX	3-4	3,0	25 %
23	58	M	DCM	ADX	3-4	1,9	25 %
24	24	M	DCM	ADXO	3-4	2,6	19 %
25	43	M	DCM	ADGXO	4	1,3	20 %
26	80	F	AS	AX			50 %
27	76	F	AS	D			60 %
28	81	F	AS	AX			60 %
29	60	M	AS	AX			65 %
30	57	M	AS	ACX			65 %
31	81	F	AS	AC			60 %

Diagnose: NF: Gesunde Spender, ICM: Ischämische Kardiomyopathie, DCM: Dilatative Kardiomyopathie, AS: Aorten Stenose. Medikamente: A: ACE-Hemmer, C: Calciumkanal-Blocker, D: Diuretika, G: Herzglykoside N: Nitrate, R: Antiarrhythmika (ausgenommen Betablocker), O: Dopamin/Dobutamin, S: Steroide, L: Clonidin, V: Vasopressin, X: Betablocker, n.d.: Nicht erhoben. (Mehel et al. 2013)

### 3.4.2 PDE2 ist in der menschlichen Herzinsuffizienz hochreguliert

Herz-Homogenate von erkrankten Patienten verglichen mit gesunden Spenderherzen (n = 6). Jede Probe wurde auf Calsequestrin (CSQ) normalisiert. Es zeigte sich eine Erhöhung der PDE2-Expression um das~2-Fache in den von einer dilatativen Kardiomyopathie (n=5) oder ischämischen Kardiomyopathie (n=5) betroffenen Patienten.

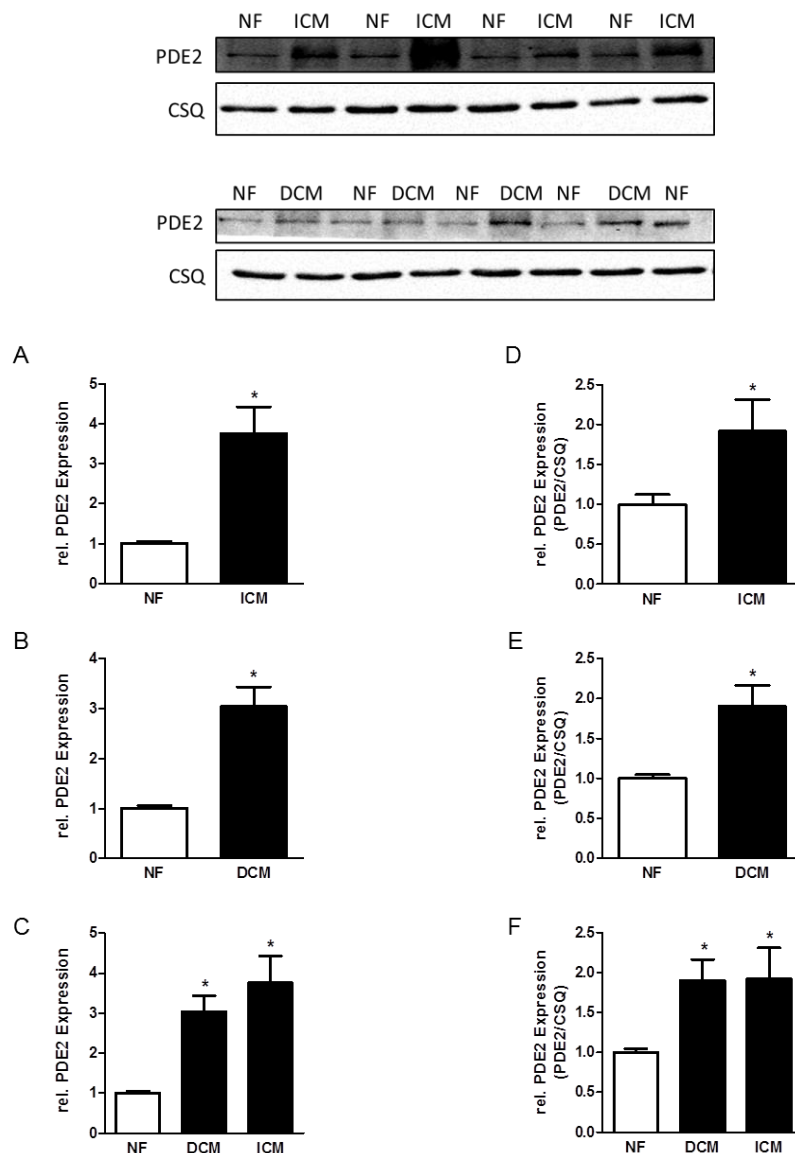


Abbildung 7: PDE2 ist in der menschlichen Herzinsuffizienz hochreguliert

Immunoblots der Phosphodiesterase-2 (PDE2)-Expression aus dem linken Ventrikel von Patienten mit End-Stage dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder ischämischer Kardiomyopathie (ICM) im Vergleich zu gesunden Spenderherzen. Graphen A-C PDE2-Expression unnormalisiert. D-F rel. PDE2-Expression normalisiert auf CSQ (NF) n=5 bis 6. \* $p \leq 0,05$  vs. NF. (Mehel et al. 2013)

### 3.4.3 PDE2 ist bei Patienten mit Aortenstenose nicht reguliert

Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in der Expression der PDE2 in Herzmuskelgewebe von gesunden Spendern (NF) und in hypertrophiertem Myokardium von Patienten, die auf Grund einer Aortenstenose (AS) sich einer Aortenklappenersatzoperation unterziehen mussten. Die Ejektionsfraktion der Patienten war präoperativ  $\geq 50\%$ .

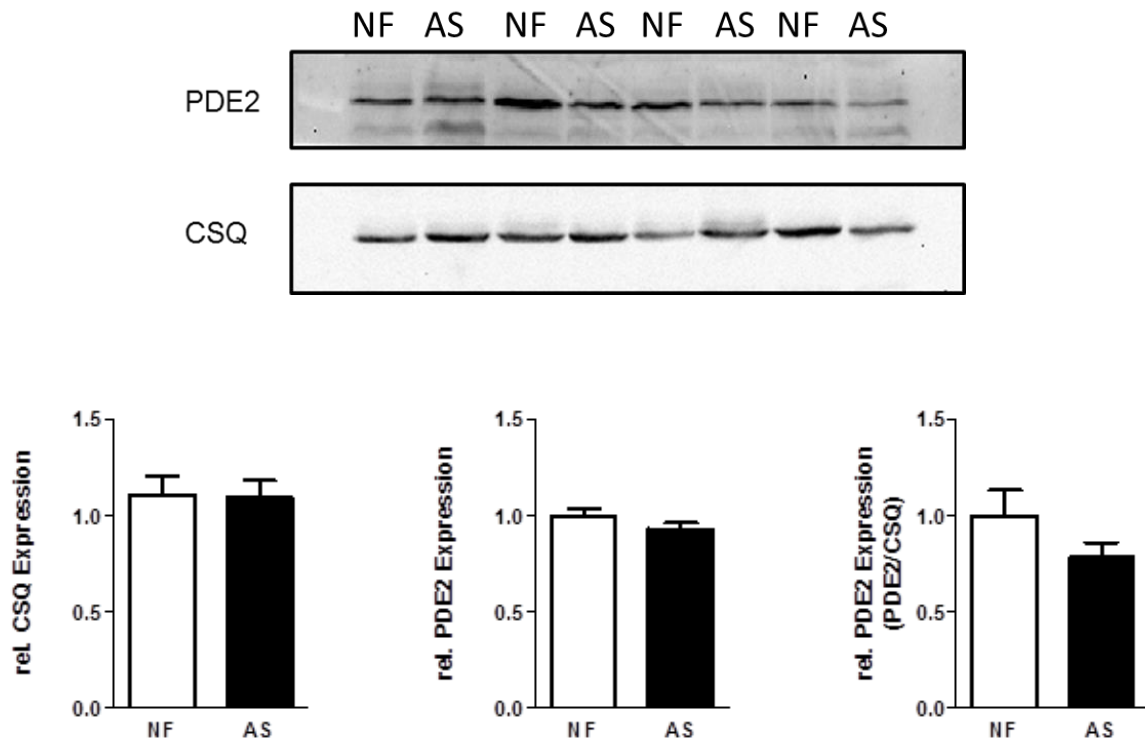


Abbildung 8: PDE2 ist bei Patienten mit Aortenstenose nicht reguliert

PDE2-Expression aus dem linken Ventrikel von Patienten mit Aortenstenose (AS) und erhaltener Ejektionsfraktion  $\geq 50\%$  verglichen mit gesunden Spenderherzen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. PDE2-Expression normalisiert auf CSQ (NF) n=5 bis 6. \* $p \leq 0,05$  vs. NF. (Mehel et al. 2013)

### 3.4.4 PDE2-Expression ist unabhängig von einer Betablocker-Einnahme

Um einen möglichen Einfluss einer Therapie mit Betablockern zu untersuchen, wurden in Proben von Patienten mit Kardiomyopathie und Betablocker-Einnahme in der Anamnese und Proben von Patienten ohne Betablocker-Vortherapie die PDE2-Expression mittels Western Blot bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

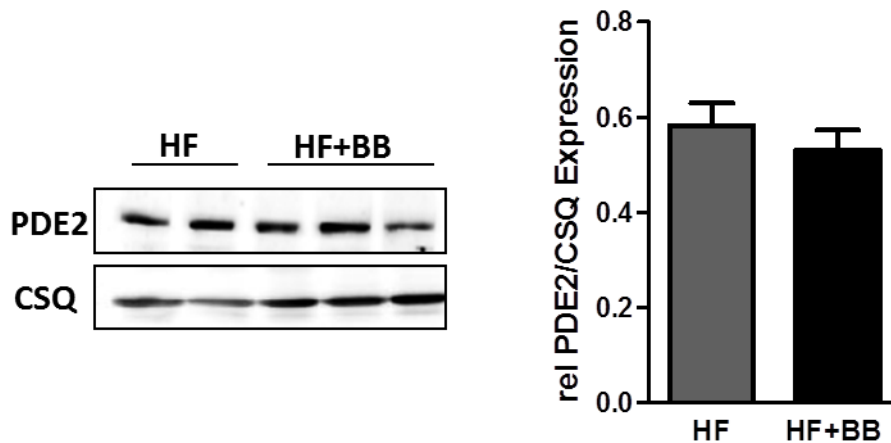


Abbildung 9: PDE2-Expression ist unabhängig von Betablocker-Einnahme

Links: Repräsentativer Auszug aus der Western Blot-Analyse mit anti-PDE2 (PDE2) und anti-CSQ (CSQ) Antikörpern. Rechts: Quantifizierung der PDE2-Expression normalisiert auf Calsequestrin (CSQ). Proben aus dem linken Ventrikel von Patienten mit Kardiomyopathie (HF) ohne und mit Betablocker-Therapie (HF+BB). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Untersuchungsgruppen; n= 6. (Mehel et al. 2013)



### 3.5 PDE2-Expression in der induzierten Herzinsuffizienz im Großtiermodell

Auf Grund der bekannten Limitationen von menschlichen Herzgewebe-Proben, wie den teilweise nicht kontrollierbaren klinischen Bedingungen, wurden die Ergebnisse der PDE2-Blots der menschlichen Herzproben in einem gut etablierten Großtiermodell reevaluiert. In dem Modell wurden Mischlingshunde über eine im linken Ventrikel angebrachte, mit einem Schrittmacher verbundene Sonde mit einer Frequenz von 240 Schlägen pro Minute für eine Dauer von 14 Tagen stimuliert und so eine Herzinsuffizienz induziert (HF). Kontrolltiere (Sham) wurden operiert, aber nicht stimuliert. Die hämodynamischen Veränderungen waren typisch für eine Dilatative Kardiomyopathie (Li et al. 1999). Im Myokard der stimulierten Tiere (HF) fand sich in der proteinanalytischen Messung etwa die 2-Fache Konzentration von PDE2 im Vergleich zu den Kontrolltieren (Sham) und damit bestätigen sich die in den menschlichen Proben erhobenen Ergebnisse.

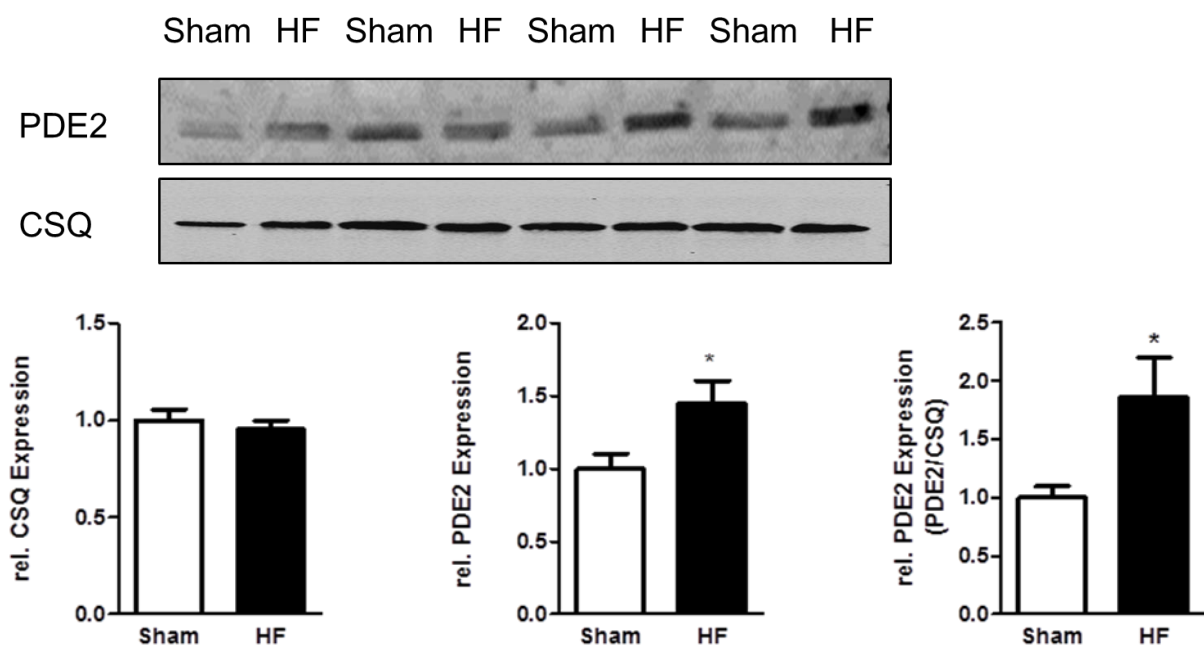


Abbildung 10: PDE2 ist in der experimentellen Herzinsuffizienz hochreguliert

Die Membran zeigt einen repräsentativen Ausschnitt des Proteinnachweises mittels anti-PDE2- und anti-CSQ-Antikörpern. Der linke Graph zeigt die CSQ-Expression, der mittlere die unnormalisierte PDE2-Expression, der rechte die auf CSQ-normalisierte PDE2 Expression von Hunden, bei denen durch Rapid Pacing eine Herzmuskelhypertrophie induziert wurde (HF), im Vergleich zu operierten, aber nicht stimulierten Tieren (Sham). n=7 bis 9 \* $p \leq 0,05$  vs. Sham. (Mehel et al. 2013)

### **3.6 PDE2-Expression und -Aktivität im linksventrikulären Myokard von Ratten nach chronischer beta-adrenerger Stimulation durch Isoprenalin**

Um zu testen, ob die gemessene PDE2-Hochregulation im Gewebe der menschlichen Spender mit terminaler Herzinsuffizienz und die durch *Rapid-Pacing* induzierte künstliche Myokardhypertrophie im Modell der Hunde, ähnlich der bekannten pathologischen Runterregulation der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren, eine Folge chronischer pathologischer  $\beta$ -adrenerger Überstimulation ist, verwendeten wir ein Modell der chronischen Isoprenalinzufuhr. Wie unter 2.4 ausführlich beschrieben, wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 240-300 g operativ mit subkutan implantierten osmotischen Minipumpen (Alzet Modell 2002) ausgestattet. Um die kontinuierliche Isoprenalin-Applikation von 2,4 mg/kg/d Körpergewicht über einen Zeitraum von 5 Tagen zu erreichen, wurde jede Pumpe gewichtsadaptiert befüllt. Die Tiere erhielten zur Analgesie bis 4 d nach der Implantation 125 mg Metamizol auf 1000 ml Trinkwasser. Kontrolltieren wurden Minipumpen mit 0,9 % NaCl implantiert.

### 3.6.1 Herz- / Körpergewicht und ANP-Expression im Modell der chronischen adrenergen Stimulation

Für die Bestimmung des Ausmaßes der Herzinsuffizienz wurde das Herzgewicht der Tiere bestimmt und auf das Körpergewicht normalisiert (HW/BW-Ratio). Bei den mit Isoprenalin behandelten Tieren (ISO) (2,4 µg/g/Tag) entwickelte sich eine Herzmuskelhypertrophie, die sich in höheren Quotienten von Herz- zu Körpergewicht abbildete. Des Weiteren konnte über die Bestimmung der relativen Transkription des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) die Induktion einer pathologischen Hypertrophie festgestellt werden. In den mit Isoprenalin behandelten Tieren fand sich eine 8-Fach höhere Konzentration von ANP-mRNA.

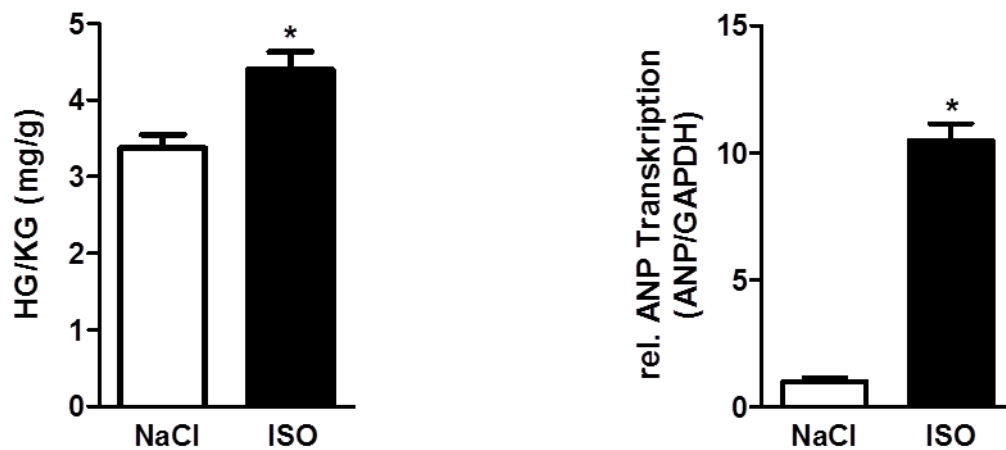


Abbildung 11: Auswirkung von chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation auf Herzgewicht und ANP-Transkription

Links sind die Herzgewichte männlicher Wistar-Ratten behandelt mit Isoprenalin (ISO) (2,4 µg/g/Tag) oder die mit Natriumchlorid (NaCl) (0,9% NaCl) behandelten Tiere, normalisiert auf das Körpergewicht (HG/KG) dargestellt. Die mit Isoprenalin stimulierten Tiere zeigen ein signifikant erhöhtes Herzgewicht,  $n=14$ ,  $*p \leq 0,05$  vs. ISO. Rechts sind die mRNA-Spiegel des atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) normalisiert auf Glycerinaldehyd -3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH);  $n=4$  bis  $6$ ,  $*p \leq 0,05$  vs. ISO. (Mehel et al. 2013)

### 3.6.2 PDE2-Expression im Isoprenalin-Modell ist auf Ebene der Transkription reguliert

Die Tiere, die der chronischen beta-adrenergen Stimulation ausgesetzt waren, zeigten eine etwa 2-Fach erhöhte PDE2-Expression und bestätigten somit die Ergebnisse aus der menschlichen Herzinsuffizienz und aus dem Großtiermodell. Um zu untersuchen, ob die erhöhte PDE2-Expression Folge einer vermehrten Transkription ist, wurden mittels Real-Time-PCR die PDE2-mRNA-Spiegel bestimmt. In den mit Isoprenalin stimulierten Herzen fanden sich ca. 4-Fach höhere PDE2-mRNA-Spiegel. Dies liefert Hinweise darauf, dass die Regulation der PDE2 im Rahmen der Herzinsuffizienz durch Transkription beeinflusst wird.

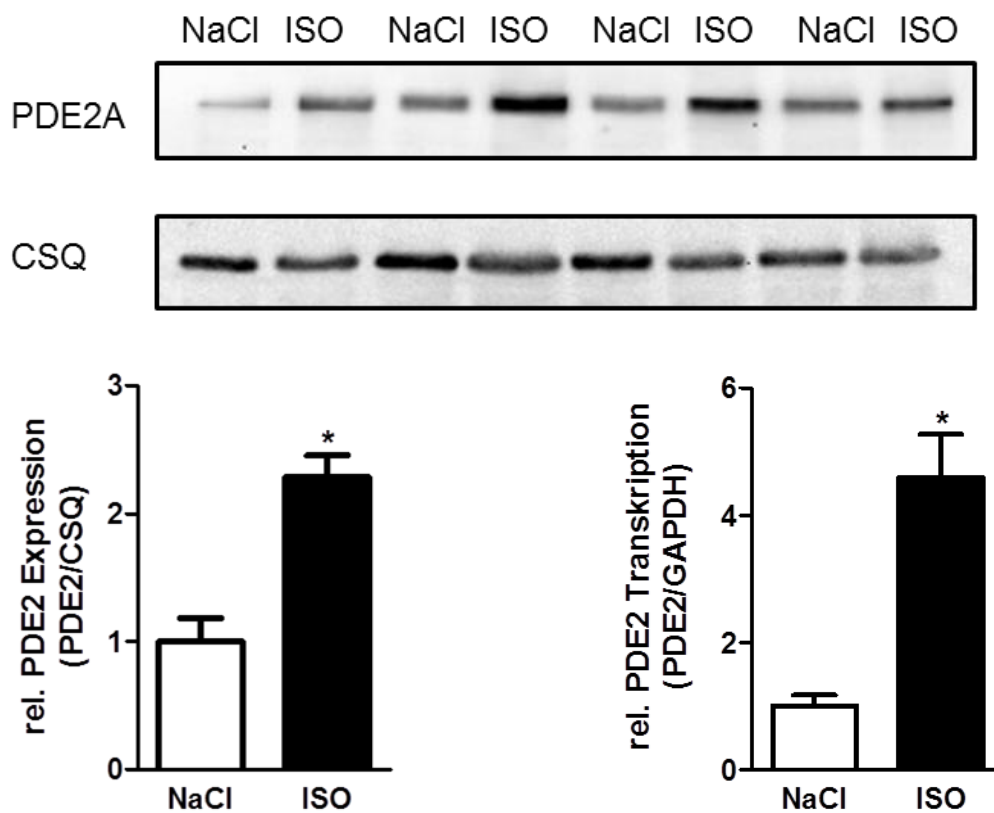


Abbildung 12: PDE2 ist in der durch Isoprenalin induzierten Herzinsuffizienz hochreguliert

Links: Der Graph repräsentiert die auf CSQ normalisierte PDE2-Expression in mit Isoprenalin (2,4 µg/g/Tag) stimulierten Tieren (ISO) im Vergleich zu den mit Natriumchlorid behandelten (0,9% NaCl) Kontrolltieren (NaCl). Es zeigte sich eine signifikante, um das ca. 2-Fach höhere PDE2-Expression in den durch Isoprenalin hypertrophierten Herzen, verglichen mit den Kontrollen. Die Membran zeigt die Proteinanalyse mittels anti-PDE2 und anti-CSQ-Antikörper. n= 8 \*p≤0,05 vs. ISO. Rechts: Linksventrikuläre PDE2-mRNA-Konzentrationen normalisiert auf GAPDH. n= 5 bis 6, \*p≤0,05 vs. ISO. (Mehel et al. 2013)

### 3.6.3 PDE2- cAMP- und cGMP-Aktivität im Rattenmodell

Um zu untersuchen, ob die auf Proteinebene erhöhte Expression der PDE2 im linken Ventrikel ebenfalls mit einer gesteigerten Enzymaktivität einhergeht, wurde die PDE2-abhängige cAMP- und cGMP-Hydrolyse mit Hilfe von  $10^5$  cpm  $^3\text{H}$ -gekoppeltem cAMP und cGMP bestimmt. Die Aktivität der PDE2 wurde als die Fraktion cAMP-PDE- bzw. cGMP-PDE-Aktivität definiert, die durch die Zugabe von 100 nM BAY 60-7550 inhibiert wurde, wie durch Thompson und Appleman beschrieben (Thompson und Appleman 1971). BAY 60-7550 ist ein hoch spezifischer PDE2-Inhibitor. Die Messungen ergaben eine ca. 4-Fache Steigerung der relativen cAMP-PDE2-Aktivität und ca. eine Verdopplung der cGMP-PDE2-Aktivität in den mit Isoprenalin behandelten Herzen im Vergleich zu den Kontrollen. Höhere PDE2-Protein-Spiegel resultieren in einer erhöhten PDE2-Aktivität. Die Messungen der PDE2-Aktivität wurden mit Frau Dr. Mehel am *French institute of Health and Medical Research*, Paris durchgeführt.

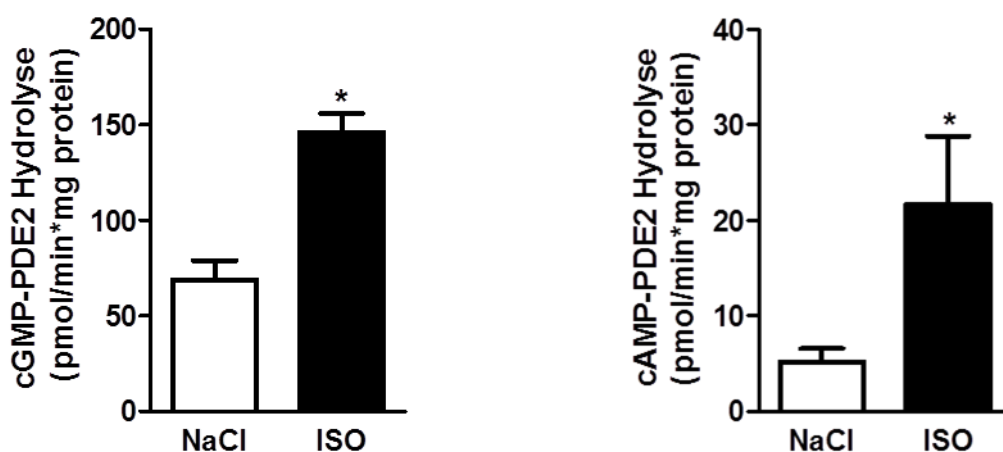


Abbildung 13: Höhere PDE2-Protein-Spiegel resultieren in einer erhöhten PDE2-Aktivität

Die PDE2-Aktivität in Gewebe aus dem linken Ventrikel wurde durch ein Radio-Immunoassay mit Tritium-gekoppelten cAMP und cGMP bestimmt. Die Graphen zeigen die PDE2-Aktivität, definiert als die durch 100 nmol inhibierte cAMP/cGMP-PDE2-Aktivität. Es zeigt sich eine signifikante um das ca. 4-Fach erhöhte cAMP-PDE2-Aktivität und eine Verdopplung der cGMP-PDE2-Aktivität in den Isoprenalin behandelten Herzen im Vergleich zu den Kontrollen.  $n = 6$ ,  $*p \leq 0,05$  vs. ISO. (Mehel et al. 2013)

### 3.7 PDE2-Überexpression schützt Herzmuskelzellen vor $\alpha/\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie ist ein frühes Zeichen der Stress-induzierten Herzinsuffizienz. Um zu sehen, ob eine Überexpression von PDE2 einen protektiven Einfluss auf die durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation hervorgerufene Hypertrophie in Herzmuskelzellen hat, wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten für 24 Stunden mit Ad-EGFP und Ad-PDE2/EGFP transfiziert. Um eine Unterscheidung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerg vermittelter Hypertrophie treffen zu können, wurden die selektiv wirkenden Agonisten Phenylephrin ( $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonist) und Noradrenalin ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist) gewählt. Ein Drittel der Zellen wurde mit Phenylephrin und ein Drittel mit Noradrenalin behandelt. Das letzte Drittel wurde als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde die erfolgreiche Infektion mittels Nachweis eines EGFP-Signals bei 488 nm Wellenlänge überprüft, die Zellen mikroskopiert und die Zellfläche bestimmt. In der nicht stimulierten Gruppe zeigte sich kein Unterschied in der Zellfläche der mit Ad-EGFP und Ad-PDE2/EGFP transfizierten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Überexpression von PDE2 keinen Einfluss auf die Zellfläche und somit kein hypertrophes Potential hat. Die PDE2-überexprimierenden Zellen waren gegen die durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation verursachte Hypertrophie geschützt und hatten eine signifikant kleinere Zellfläche. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine PDE2-Überexpression mit einer einhergehenden Steigerung der cAMP- und cGMP-PDE2-Aktivität einen protektiven Einfluss auf die Kardiomyozyten unter pathologischer chronischer  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerger Exposition hat. Die Messungen der Zelloberfläche wurden mit Frau Dr. Mehel am *French Institute of Health and Medical Research* durchgeführt. (Mehel et al. 2013)

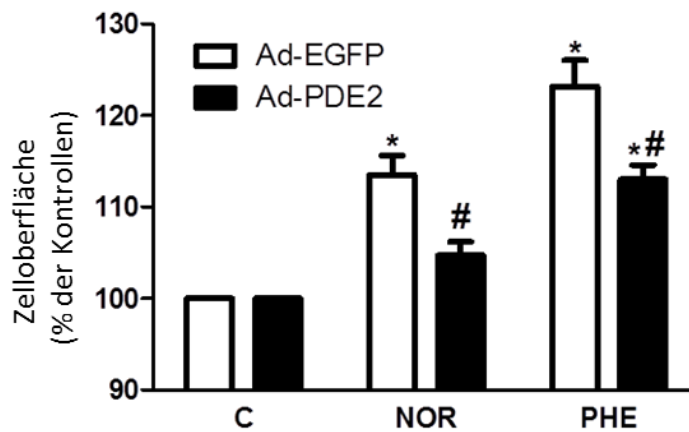


Abbildung 14: PDE2-Überexpression schützt Herzmuskelzellen vor durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulation hervorgerufener Hypertrophie

Die Abbildung zeigt neonatale Ratten-Herzmuskelzellen infiziert mit Ad-EGFP (weiß) und Ad-PDE2 (schwarz) und einer Stimulation mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Noradrenalin (NOR) und Phenylephrin (PHE), sowie Kontrollen (C) für 24 h. Die Graphen zeigen die ermittelten Zelloberflächen in %, bezogen auf die jeweilige Kontrolle.  $n = 5$  bis  $6$ , \* $p \leq 0,05$  vs. C; # $p \leq 0,05$  vs. Ad-EGFP vs. Ad-PDE2. (Mehel et al. 2013)

### 3.8 PDE2-Lokalisation

#### 3.8.1 PDE2A3-Lokalisation in adulten Ratten-Herzmuskelzellen

Da bislang in der Literatur keine einheitlichen Daten zur intrazellulären Lokalisation der PDE2A3 vorliegen, wurden adulte Ratten-Herzmuskelzellen für 48 Stunden mit Ad-EGFP/PDE2A3 und Ad-EGFP mit einer MOI von 100 infiziert. Nach Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI (blau), EGFP (grün) und anti-PDE2 (rot), wurden die Zellen fixiert und am konfokalen Mikroskop betrachtet und Bilder gemacht. Wie in der unten stehenden Abbildung gut erkennbar, sind die Zellkerne durch DAPI blau gefärbt und das grüne EGFP-Signal bildet die Actin- und Myosin-Struktur nach. Die immunhistologische Färbung mit anti-PDE2 zeigt in den mit Ad-PDE2A3 infizierten Zellen ein Signal entlang definierter Linien, was auf Lokalisation entlang der Z-Linie hindeuten könnte.

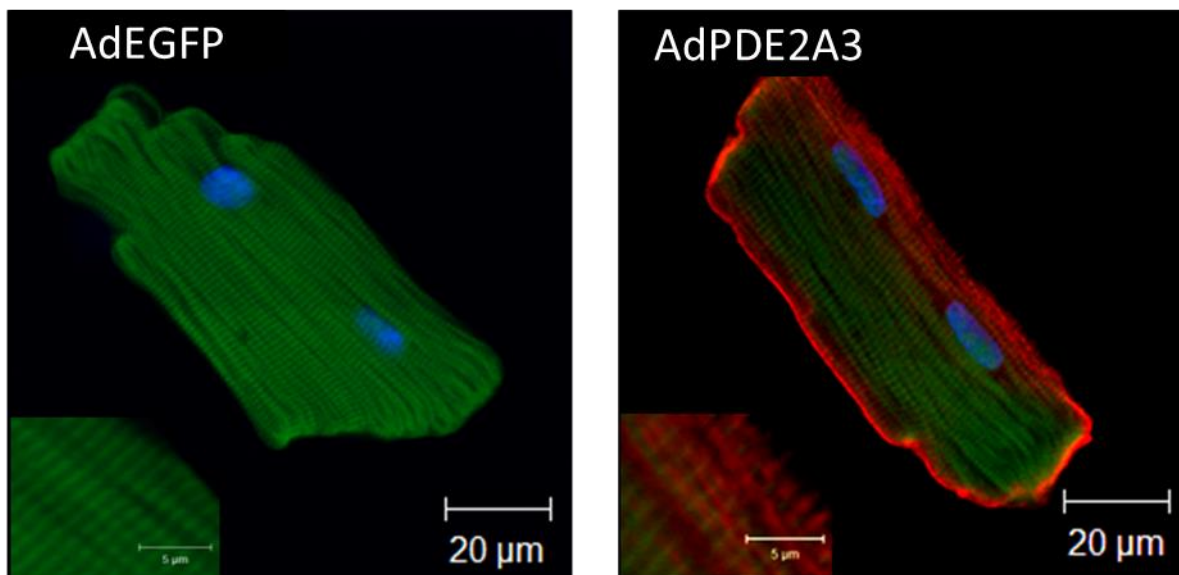


Abbildung 15: Viral überexprimierte PDE2A3 ist entlang definierter Linien lokalisiert

Die linke Graphik zeigt eine mit Ad-EGFP infizierte adulte Ratten-Herzmuskelzelle, die rechte eine mit Ad-PDE2A3/EGFP. Der Maßstab beträgt 20 µm. Der sich im Bild links unten befindende Ausschnitt hat eine Vergrößerung von 5 µm.



## 4 Diskussion

Unter Stresssituationen benötigt der Körper die Möglichkeit, kurzfristig und sehr fein abgestimmt das Herzminutenvolumen um das 5-Fache zu steigern, um eine ausreichende Versorgung der Organe und des Gewebes sicherzustellen. Die Kontrolle der Herzaktivität unterliegt dem Sympathischen und Parasympathischen Nervensystem. Durch die Bindung der Katecholamine an die  $\beta$ -Adrenozeptoren wird über ein regulatorisches G-Protein der Stimulus auf die Adenylatcyclase übertragen und damit die Bildung von cAMP angeregt. Das intrazelluläre cAMP, der sekundäre Botenstoff, bedingt eine Zunahme der Proteinkinase A und dadurch einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und eine Zunahme des Herzzeitvolumens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass die Expression der PDE2 im Rahmen der Herzinsuffizienz beim Menschen reguliert ist. Im Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zeigte sich eine um den Faktor 2 erhöhte PDE2-Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hochregulation der PDE2-Expression unabhängig von einer Betablocker-Einnahme ist. Auf Grund der bekannten Limitationen von menschlichen Gewebeproben, wurde die erhöhte PDE2-Expression in einem Großtiermodell bestätigt. Im chronischen Isoprenalin-Stressmodell konnte der Zusammenhang von erhöhter PDE2-Expression als Konsequenz auf chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation hergestellt werden. Die vermehrte Produktion von PDE2-Protein ist durch eine vermehrte Transkription von PDE2-mRNA bedingt. Die erhöhten PDE2-Spiegel gehen mit einer erhöhten hydrolytischen Aktivität für cAMP einher. Eine virale Überexpression von PDE2 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten schützt die Zellen vor durch  $\beta$ -adrenerger Stimulation hervorgerufener Hypertrophie. (Mehel et al. 2013)

### 4.1.1 PDE2 ist in der Herzinsuffizienz hochreguliert

Für die PDE3A und PDE4D ist in der menschlichen Herzinsuffizienz eine verminderte Expression beschrieben (Ding et al. 2005, Lehnart et al. 2005). Für die PDE 5 ist bekannt, dass sie im gesunden Myokard nur sehr gering exprimiert wird, in insuffizienten Herzen konnte ein gesteigerter Proteingehalt und ein Einfluss auf die Kontraktilität nachgewiesen werden (Shan et al. 2012). Die absolute Menge an PDE2-Protein in gesundem Myokard ist ebenfalls relativ gering und eine Inhibition der PDE2 hat nur wenig Einfluss auf die cAMP-Hydrolyse in gesunden Kardiomyozyten. Unter normalen Bedingungen wird der Großteil der Hydrolyse von cAMP im Myokard durch die PDE3A verursacht. Die PDE3 besitzt eine hohe Hydrolyserate für cAMP und eine hohe Affinität zu cGMP. Die hohe Affinität und sehr niedrige Hydrolyserate der PDE3

zu cGMP, machen dieses zu einem kompetitiven Inhibitor für die cAMP-Hydrolyse (Beavo 1995). Der Einfluss der PDE3 in der Herzaktion wird deutlich in ihrer Rolle für die Regulation der kardialen Kontraktion über eine Modulation des  $I_{ca}$  durch Veränderung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung (Fischmeister und Hartzell 1990). Vereinfacht lässt sich sagen, dass cGMP die PDE2 aktiviert und gleichzeitig die PDE3 inhibiert (Degerman et al. 1997). Die Daten in dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass PDE2 in der menschlichen Herzinsuffizienz hochreguliert ist. Diese um rund 2-Fach erhöhte Proteinmenge deutet bereits auf eine mögliche pathophysiologische Bedeutung der PDE2 in der kardialen Hypertrophie hin. Es lässt sich somit vermuten, dass die im Rahmen der Herzinsuffizienz stattfindende vermehrte Produktion von cGMP die PDE3 abhängige cAMP-Hydrolyse durch Bindung von cGMP vermindert wird und auf der anderen Seite die PDE2 durch die Bindung von cGMP in ihrer cAMP-Hydrolyseaktivität gesteigert wird. Auf Grund der bekannten Limitationen in der Verwendung von menschlichen Spendergeweben in wissenschaftlichen Fragestellungen, wie nicht einheitlich kontrollierbare klinische Einflüsse, wurden die Ergebnisse in einem Großtiermodell reevaluiert und die sich anschließenden funktionellen Daten in unter Laborbedingungen verfügbaren Kleintiermodell erhoben. (Mehel et al. 2013)

Die von Bristow et al. gezeigte Wiederherstellung der normalen Herzphysiologie mit Runterregulation von  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch Betablocker-Therapie (Bristow et al. 1982), konnte nicht auf die Regulation der PDE2 übertragen werden. Es fanden sich keine Unterschiede in der Expression der PDE2 in Patienten, die mit Betablockern behandelt wurden im Vergleich zu unbehandelten. Dieses kann auf einen anderen Regulationsmechanismus der Expression der PDE2 in der Herzinsuffizienz hinweisen. Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der PDE2 in den Herzen von gesunden Spendern und Patienten mit Aortenstenose. Diese zeichnen sich durch eine beginnende Myokardhypertrophie bei noch erhaltenen Herzfunktion aus. Diese Ergebnisse lassen den Schluss auf eine Zunahme des Einflusses der PDE2 mit zunehmender Dekompensation der Herzinsuffizienz und nicht im Beginn des Remodeling zu und geben Anlass zu weiteren Untersuchungen im finalen Stadium der Herzinsuffizienz. (Mehel et al. 2013)

### **4.1.2 PDE2-Hochregulation als Folge von chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation**

Das in der Arbeit verwendete Modell der Langzeitapplikation mit Isoprenalin zeigt viele Parallelen zur menschlichen Herzinsuffizienz. Es zeigt sich ein erhöhtes Herz-/Körpergewicht-Verhältnis als Indikator für eine Herzhypertrophie sowie die Induktion des fetalen Genprogramms im Herzgewebe der stimulierten Tiere (Wittköpper et al. 2010, El-Armouche et al. 2008). In dem Modell konnten ebenfalls höhere Spiegel an PDE2 nachgewiesen werden. So, dass die vermehrte Expression von PDE2 als Folge einer Zunahme von beta-adrenerger

Stimulation gewertet werden kann. Die mRNA-Transkription und auch die PDE2-spezifische cAMP- und cGMP-Hydrolyse waren erhöht. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Regulation der PDE2-Expression in der Herzinsuffizienz auf der Ebene der Transkription abläuft und mit einer vermehrten katalytischen Aktivität einhergeht. (Mehel et al. 2013)

#### **4.1.3 PDE2-Überexpression schützt vor $\alpha/\beta$ -AR induzierter Hypertrophie**

Die Stimulation mit Katecholaminen führt durch eine veränderte Genexpression und einer Zunahme der Proteinsynthese zu Zellhypertrophie. Neonatale Ratten-Kardiomyozyten, die durch adenovirale Transfektion PDE2 überexprimieren, zeigen geringere Hypertrophie bei Stimulation mit Norepinephrin (Noradrenalin) und Adrenalin. Die antihypertrophen Eigenschaften einer PDE2-Überexpression bei erhaltener Kontraktilität (Daten nicht gezeigt) lassen den Schluss zu, dass die Hochregulation ein kompensatorischer Mechanismus sein könnte, der das Myokard, ähnlich der bekannten  $\beta_1$ -AR Runterregulation, schützt. Es muss beachtet werden, dass sich die hier gefundenen Ergebnisse nur über die Oberflächenbestimmung und nicht durch Hypertrophiemarker stattgefunden hat. Des Weiteren handelt es sich um viral überexprimierte PDE2 und eine 2D-Kultur. Die gesehenen Effekte müssen sich nicht zwingend auf das lebende Herz übertragen lassen. In der im August 2015 veröffentlichten Arbeit von Zoccarato (Zoccarato et al. 2015) kommen die Autoren zu dem Schluss, dass sich eine Inhibition der PDE2 protektiv auf die Zellhypertrophie auswirkt und schließen daraus, dass sich eine Inhibition der PDE2 therapeutisch nutzen lassen könnte. Kontroverse Daten sind in diesem frühen Stadium der Forschung nicht überraschend und liegen häufig in unterschiedlichen methodischen Ansätzen bzw. konzeptionellen Ausgangspunkten begründet. Die hieraus entstehenden Diskussionen beschleunigen in der Regel die Entwicklung des Feldes, da sie dazu zwingen, die eigenen Ergebnisse und Hypothesen fortwährend kritisch zu hinterfragen, die Experimente noch genauer zu planen und mit immer detaillierteren Methoden zu arbeiten. In der Literatur gibt es immer mehr Beispiele dafür, dass insbesondere in komplexen pathologischen Modellen ein und dasselbe Molekül kontextbezogen durchaus auch diametral entgegengesetzte Funktionen ausüben kann, z.B. abhängig vom genetischen Hintergrund, Erkrankungsstadium, Komorbiditäten und/oder Komedikation. Der scheinbare Konflikt der Daten bzw. Hypothesen zeigt die dringende Notwendigkeit weiterer detaillierter Versuche zur Rolle der PDE2 im Herzen auf. Zum Beispiel könnten Experimente zur zellulären Lokalisation der PDE2 und insbesondere der Modulation von spezifischen cAMP-Pools bei akuter und chronischer PDE2-Überexpression sowie deren Hemmung Daten über die Effekte der PDE2 auf die kardiale Hypertrophie liefern. (Mehel et al. 2013)

#### **4.1.4 Viral überexprimierte PDE2A3 stellt sich entlang definierter Linien des Sarkomers dar**

In einer Vielzahl von Geweben wurden Phosphodiesterasen nachgewiesen. Ein Nachweis der PDE2 ist bis dato im Herzen, der Leber, der Nebenniere, im Gehirn, in Endothelzellen und Makrophagen erbracht worden (Martins et al. 1982, Bender und Beavo 2006). Aus dem PDE2-kodierenden Gen sind 3 verschiedene Spleißvarianten der PDE2 bekannt: PDE2A1 (Sonnenburg und Beavo 1991), PDE2A2 (Yang et al. 1994), PDE2A3 (Sadhu et al. 1999). Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur nur in den N-terminalen Aminosäuren. Es wird davon ausgegangen, dass das N-terminale Ende für die Lokalisation verantwortlich ist (Rosman et al. 1997). Als erstes wurde 1982 die Spleißvariante PDE2A1 als lösliches Protein aus bovinen Herzen isoliert (Martins et al. 1982). Darauf folgend konnten aus Rattenleber sowohl eine membrangebundene, als auch eine cytosolische PDE2-Variante isoliert werden. Es konnten keine Unterschiede in den katalytischen Eigenschaften der cytosolischen und der membrangebundenen Formen festgestellt werden (Pyne et al. 1986).

Die Löslichkeit der PDE2A1 kommt durch eine N<sup>α</sup>-Acetylierung des N-Terminus zustande. Der Mechanismus der N<sup>α</sup>-Acetylierung am N-Terminus wurde bei der Calmodulin-abhängigen PDE1 beschrieben (Novack et al. 1991). Es konnten keine weiteren posttranslationalen Veränderungen der PDE2A1 im Vergleich zu den membrangebundenen Formen festgestellt werden. Für den Verankerungsmechanismus der PDE2A2 ist zum einen ein stark hydrophobes N-terminales Segment beschrieben (Yang et al. 1994), zum anderen wird über Protein-Protein-Interaktionen oder durch Palmitoylierung, einem Prozess bei dem Palmitat an Cysteinreste gebunden wird, (Noyama und Maekawa 2003) diskutiert. Die durch Triton X-100 lösliche Bindung der PDE2A3 wird durch N-Myristoylierung, eine Anhängung von Myristat an einen Glycinrest des Proteins am N-Terminus, bedingt (Russwurm et al. 2009).

Da die PDE2 basal nur sehr gering exprimiert wird, wurde auf eine virale Überexpression zurückgegriffen. Die adenovirale Überexpression von PDE2A3 in adulten Ratten-Kardiomyozyten zeigt die PDE2A3 an der Membran entlang der sarcomerischen Z-Linie befestigt. Die Lokalisation an der Z-Linie ist mit den durchgeführten Färbungen nicht eindeutig belegbar, da keine Färbungen zur Colokalisation oder spezifische Färbung der Z-Linie z. B. mit sarcomerischem  $\alpha$ -Actinin durchgeführt wurde. Die Daten der Arbeitsgruppe von Zoccarato (Zoccarato et al. 2015) stützen die Hypothese, dass die PDE2A an der Z-Linie colokalisiert ist, sie zeigten, die PDE2A zu ca. 80 % mit der Z-Bande colokalisiert. Diese mögliche Lokalisierung der PDE2 an der sarcomerischen Z-Linie könnte ein Hinweis auf lokale Effekte und Kompartimentierung der cAMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterasen sein. Auch lassen sich dadurch Rückschlüsse auf die protektive Wirkung der PDE2 in den mit Katecholaminen

gestressten Zellen ziehen. Die relativ geringe cAMP-Hydrolyse der PDE2 von weniger als 5 % an der gesamten PDE-Aktivität in der Kardiomyozyte und die gegenüberstehende potente Modulation katecholaminer Effekte auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten und Kontraktilität weisen darauf hin, dass die PDE2 eine große Rolle in der lokalen Kontrolle von cAMP nach  $\beta$ -AR-Stimulation besitzt (Mongillo et al. 2006). Kritisch zu beachten ist, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Lokalisation durch eine artifizielle Expression nachgewiesen wurde und nicht der endogenen Lokalisation entsprechen muss.

## 4.2 Limitationen

Die Rolle der PDE2 wurde in verschiedenen Spezies, einschließlich im Menschen untersucht. Es sind verschiedene Isoformen und Expressionsmuster in unterschiedlichen Spezies bekannt (Zaccolo und Movsesian 2007, Fischmeister et al. 2006). Da die meisten hier gezeigten funktionellen Versuche nicht im Menschen, sondern im Tiermodell durchgeführt worden sind, könnten die Regulation und der Einfluss der PDE2 auf den Ventrikel im Menschen auf Grund der Artendiversität der PDE-Isoformen in den unterschiedlichen Spezies anders sein. Die bisher vorhandenen Inhibitoren der PDE2 sind bislang nur *in vitro* untersucht worden, transgene Tiermodelle für einen tieferen Einblick der Rolle der PDE2 in der Herzinsuffizienz existierten zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht. Deshalb wurden auf adenovirale Überexpression und Inhibition *in vitro* zurückgegriffen. Diese Ergebnisse müssen sich nicht zwangsläufig auf die komplexe Regulation der Phosphodiesterasen *in vivo* übertragen lassen. (Mehel et al. 2013)

## 4.3 Klinische Relevanz und Neuheit der Ergebnisse

Da die Herzinsuffizienz eine der weitverbreitetsten Todesursachen in der westlichen Welt ist und die aktuellen Therapien der Herzinsuffizienz trotz ihrer Komplexität leider nur moderate Ergebnisse liefern, bedarf es neuer Therapien. Neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz liefern neue therapeutisch nutzbare Ansatzpunkte. Vielfach wurden bereits die positiven Effekte von erhöhten cGMP-Spiegeln in der Herzinsuffizienz untersucht, hervorgerufen entweder durch eine Inhibition der cGMP-hydrolysierenden PDE5 oder durch eine Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (Lee und Kass 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die anfängliche Hypothese, dass über eine indirekte Verstärkung des cGMP-Signalweges die Herzaktion entspannt werden kann und so die negativen Einflüsse der exzessiven katecholaminen Stimulation in der HF abgeschwächt werden können. (Mehel et al. 2013)

## 5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist einer der häufigsten Gründe für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Die Prognose der Herzinsuffizienz ist nach wie vor schlecht, 50 % der Erkrankten versterben innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung. Diese Situation erfordert die Erforschung neuer Zielmoleküle und neuer Behandlungsstrategien.

In der Herzmuskelzelle stehen sich auf molekularer Ebene zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Effektor der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als Effektor des Signalwegs natriuretischer Peptide (NP) gegenüber. Ein typisches molekulares Merkmal, das einer terminalen Insuffizienz vorangeht, ist eine Verminderung der Signalübertragung des cAMPs auf der einen Seite und eine Erhöhung der cGMP-Signalübertragung auf der anderen Seite. Hohe cAMP-Spiegel im Herzen werden meist als schädlich betrachtet, cGMP-abhängige Signalkaskaden hingegen vorwiegend als protektiv. Die intrazelluläre Kompartimentierung, die Amplitude und Halbwertszeit dieser beiden Signalmoleküle hat dabei entscheidende Wirkung auf deren Effektoren. Den Phosphodiesterasen (PDEs) kommt hierfür eine entscheidende Funktion zu. Unter der PDE-Superfamilie baut das Isoenzym Phosphodiesterase Typ 2 (PDE2) cAMP ab und wird durch cGMP allosterisch reguliert: Die Bindung von cGMP steigert den PDE2-abhängigen Abbau von cAMP um ein Vielfaches und hemmt auf diese Weise die Folgen einer Sympathikus-Aktivierung in der Herzmuskelzelle. PDE2 steht damit im Zentrum eines negativen Crosstalks der cAMP- und cGMP-Signalkaskade.

Die Rolle der kardialen PDE2 und ihre Funktion während der Herzinsuffizienz werden noch nicht ausreichend verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass die Expression myokardialer PDE2 im Rahmen der Herzinsuffizienz beim Menschen reguliert ist. Wie in der Literatur beschrieben, fand sich im gesunden Myokard eine geringe basale PDE2-Expression. Dagegen zeigte sich im linksventrikulären Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine um den Faktor 2 erhöhte PDE2-Expression. Interessanterweise zeigten die Daten, dass die Hochregulation der PDE2-Expression bei Patienten mit Herzinsuffizienz unabhängig von einer Betablocker-Behandlung war. Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede in der myokardialen PDE2-Expression zwischen gesunden Spendern und Patienten mit Aortenstenose bei erhaltener Herzfunktion. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Einfluss der myokardialen PDE2 mit zunehmender Dekompensation der Herzinsuffizienz wächst. Auf Grund der bekannten Limitationen von menschlichen Gewebeproben wurde die Zunahme der myokardialen PDE2-Expression bei terminaler

Herzinsuffizienz im Großtiermodell Hund bestätigt. Erwartungsgemäß fand sich in den Tieren, bei denen durch eine Schrittmachersonde eine Herzinsuffizienz induziert wurde, eine um Faktor 2 erhöhte myokardiale PDE2-Expression. Dass diese vermehrte Expression von PDE2 eine Folge von chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation ist, wurde schließlich mit einem Isoprenalin-Stressmodell in der Ratte bestätigt. In diesem Modell fand sich bei chronisch mit Isoprenalin behandelten Tieren eine ebenfalls erhöhte myokardiale PDE2-Expression. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese gesteigerte PDE2-Expression durch eine vermehrte Transkription von PDE2-mRNA im Myozyt bedingt ist. Auf funktioneller Ebene konnte bestätigt werden, dass die in der terminalen Herzinsuffizienz erhöhte PDE2-Expression mit einer ebenfalls erhöhten hydrolytischen Aktivität für cAMP einhergeht. Mechanistisch konnten zudem neonatale Ratten-Kardiomyozyten durch eine adenovirale PDE2-Überexpression vor  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie geschützt werden.

PDE2 ist in der Herzinsuffizienz hochreguliert und spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der für die Herzinsuffizienz zentralen cAMP- und cGMP-Signalwege. Die Einflussnahme auf die Regulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade durch Kontrolle der cAMP-Spiegel durch Phosphodiesterasen könnte sich positiv auf die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz auswirken. Die Möglichkeit einer Steigerung der cAMP-Hydrolyseaktivität der myokardialen PDE2, könnte folglich eine neue therapeutische Option zur Behandlung der Volkskrankheit Herzinsuffizienz darstellen. Weitere Untersuchungen werden klären müssen, wie sich eine Aktivierung der myokardialen PDE2 unter pathologischen Bedingungen im Sinne der Progression zur terminalen Herzinsuffizienz auswirkt.



## 6 Anhang

### 6.1 PCR-Ansätze und Bedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und Sonden wurden mit der Software Primer 3 designt und von der Firma Eurofind MWG Operon hergestellt.

Tabelle 3: PCR-Bedingungen

<i>PCR-Bedingungen</i>	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
	Denaturierung	94 °C	10:00	1
	Denaturierung	94 °C	00:15	
	Hybridisierung	60 °C	00:45	32
	Elongation	72 °C	00:45	
	Elongation	72 °C	07:00	1

Tabelle 4: PCR-Ansätze

	Substanz	Volumen ( $\mu$ l)
PCR-Ansatz für GAPDH (25 $\mu$ l)		
	GAPDH for (10 $\mu$ M)	1,5
	GAPDH rev (10 $\mu$ M)	1,0
	dNTPs (10 mM)	2,0
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0
	10-Fach PCR Puffer	2,5
	AmpliTaq Gold	0,75
	cDNA (siehe Kap. 2.8.2)	3
	Aqua ad iniectabilia	11,25
PCR-Ansatz für die PDE2 (25 $\mu$ l)		
	PDE2 for (10 $\mu$ M)	0,5
	PDE2 rev (10 $\mu$ M)	0,5
	dNTPs (10 mM)	0,25
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0
	10-Fach PCR Puffer	2,5
	AmpliTaq Gold	0,25
	cDNA (siehe Kap. 2.5.3)	2,0
	Aqua ad iniectabilia	17,0
PCR-Ansatz für die ANP (25 $\mu$ l)		
	ANP for (10 $\mu$ M)	0,5
	ANP rev (10 $\mu$ M)	0,5
	dNTPs (10 mM)	0,25
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0
	10-Fach PCR Puffer	2,5
	AmpliTaq Gold	0,25
	cDNA (siehe Kap. 2.5.3)	2,0
	Aqua ad iniectabilia	17,0

## 6.2 Antikörper

Tabelle der bei den Proteinanalytischen Verfahren mittels Western Blot verwendeten Antikörper (pk: polyklonal; Anti-m: Anti-Maus; Anti-r: Anti-Kaninchen; Anti-g: Anti-Ziege; IgG: Immunglobulin G; -HRPO: konjugiert an Meerrettich-Peroxidase):

Tabelle 5: Antikörper

1. Antikörper	Verd.	Firma	2. Antikörper	Verd.
CSQ (pk)	1:2500	Dianova	Anti-r-IgG-HRPO	1:5000
HA-tag (pk)	1:1000	Invitrogen	Anti-r-IgG-HRPO	1:10000
PDE2 (pk)	1:500	FabGennix	Anti-r-IgG-HRPO	1:10000
PDE2 (pk)	1:200	Santa Cruz	Anti-g-IgG-HRPO	1:10000

Alle Sekundärantikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Santa Cruz bezogen.

### 6.3 Substanzen

Tabelle 6: Substanzen

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Alpha- <sup>32</sup> P-dCTP	Hartmann Analytics
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Aqua ad injectabilia	Braun
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson
Bacto™ Yeast	Becton Dickinson
Bovine serum albumin (BSA)	Ambion
Bromphenolblau	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dobutamin	Fresenius
Ethanol absolut	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glycin	AppliChem
Histidin	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	AppliChem
Isoprenalin Hydrochloride	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem

## Anhang

---

Substanz	Hersteller
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kanamycin	Gibco® Invitrogen
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchloridhexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	AppliChem
Mercaptoethanol	Gibco
Metamizol	Ratiopharm
Methanol	AppliChem
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Braun
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natrium-EDTA	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Ponceau-S	AppliChem
Proteinase K	Roth
Saccharose	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Tetranatriumdiphosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-Base	Sigma-Aldrich
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem
Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	AppliChem
Ziegenserum	PAA Laboratories

## 6.4 Hilfsmittel und Geräte

Tabelle 7: Hilfsmittel und Geräte

Hilfsmittel und Geräte	Hersteller
Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT	Bio-Rad
Analysewaage	Sartorius AG
Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips	Sarstedt
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus
Elektrophoresespannungsgerät PowerPack P25	Biometra
Elektrophoresespannungsgerät PowerPac Basic	Bio-Rad
Elektrophoresespannungsgerät PowerPac HC	Bio-Rad
Elektrophoresesystem (Mini Protean <sup>®</sup> electrophoreses cell)	Bio-Rad
Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Gewebekulturplatten, 6-well	Nunc
Horizontalschüttler Rocking Platform	Biometra
Hybridization bottles HB-OV-BM	Thermo EC
Hybridization mini oven MKli HYBAID	Thermo EC
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf
Küvetten (10 x 4 x 45 mm), 67.742	Sarstedt
Magnetrührer Ikamag <sup>®</sup> Reo	Schütt
PCR-Gerät GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700	Applied Biosystems
Photometer, BioPhotometer 6131	Eppendorf
pH-Meter	InoLab
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetten, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt

## Anhang

---

Hilfsmittel und Geräte	Hersteller
Polytron Stativ-Dispergiergerät	Kinematica
Tischzentrifuge Combi-Spin FVL-2400N	Peqlab
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman®
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt

## 7 Literaturverzeichnis

Aravind L, Ponting CP (1997): The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* 22, 458-459

Beavo JA (1995): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75, 725-748

Beavo JA, Conti M, Heasley RJ (1994): Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 46, 399-405

Bender AT, Beavo JA (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58, 488-520

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982): Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205-211

Böhm M, Hallek M, Schmiegeler W (Hrsg.): *Innere Medizin. Begründet v. Classen M, Diehl V, Kochsiek k.6., komplett überarb. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2009*

Brodde OE (1993): Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 60, 405-430

Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC (1997): Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem* 272, 6823-6826

Ding B, Abe J, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, Zhao A, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, et al. (2005): Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111, 2469-2476

El-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14, 225-241

El-Armouche A, Gocht F, Jaekel E, Wittkopper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007a): Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9, 1077-1080



El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007b): Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43, 223-229

El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, et al. (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80, 396-406

Fischmeister R, Hartzell HC (1990): Regulation of calcium current by low-K<sub>m</sub> cyclic AMP phosphodiesterases in cardiac cells. *Mol Pharmacol* 38, 426-433

Fischmeister R, Castro LRV, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevičius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006): Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99, 816-828

Francis SH, Blount MA, Corbin JD (2011): Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91, 651-690

Hartzell HC, Fischmeister R (1986): Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature* 323, 273-275

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514

Kass A, Takimoto E, Nagayama T, Champion H (2007): Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res* 75, 303-304

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E (1996): Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 78, 91-101

Kostic MM, Erdogan S, Rena G, Borchert G, Hoch B, Bartel S, Scotland G, Huston E, Houslay MD, Krause EG (1997): Altered expression of PDE1 and PDE4 cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in 7-oxo-prostacyclin-preconditioned rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 29, 3135-3146

Lee DI, Kass DA (2012): Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology* 27, 248-258

Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR (2005): Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123, 25-35

Levy F (2013): Cardiac PDEs and crosstalk between cAMP and cGMP signalling pathways in the regulation of contractility. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386, 665-670

Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S (1999): Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100, 87-95

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003): What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93, 896-906

Loughney K, Martins TJ, Harris EAS, Sadhu K, Hicks JB, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K (1996): Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* 271, 796-806

Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, et al. (2007): A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2, 1236-1247

Manganiello Vc, Tanaka T, Murashima S (1990): Cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Beavo J, Houslay M (Hrsg.): *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: structure, regulation and drug action*. John Wiley & Sons, Chichester 1990, 61-85

Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA (2002): The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13260-13265

Martins TJ, Mumby MC, Beavo JA (1982): Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem* 257, 1973-1879

McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602

Meacci E, Taira M, Moos M, Smith CJ, Movsesian MA, Degerman E, Belfrage P, Manganiello V (1992): Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3721-3725

Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittkopper K, Seppelt D, Dewenter M, Lutz S, Sossalla S, Maier LS, Lechene P, et al. (2013): Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 62, 1596-1606

Mery PF, Pavoine C, Pecker F, Fischmeister R (1995): Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 48, 121-130

Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012): PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 52, 323-329

Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolocci N, Houslay MD, et al. (2006): Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts  $\beta$ -adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 98, 226-234

Novack JP, Charbonneau H, Bentley JK, Walsh KA, Beavo JA (1991): Sequence comparison of the 63-, 61-, and 59-kDa calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Biochemistry* 30, 7940-7947

Noyama K, Maekawa S (2003): Localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 in the brain-derived Triton-insoluble low-density fraction (raft). *Neurosci Res* 45, 141-148

Onody A, Zvara A, Hackler L, Vigh L, Ferdinandy P, Puskas LG (2003): Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett* 536, 35-40

Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS (2009): Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18225-18230

Pokreisz P, Vandewijngaert S, Bito V, Van Den Bergh A, Lenaerts I, Busch C, Marsboom G, Gheysens O, Vermeersch P, Biesmans L, et al. (2009): Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 119, 408-416

Pyne NJ, Cooper ME, Houslay MD (1986): Identification and characterization of both the cytosolic and particulate forms of cyclic GMP-stimulated cyclic AMP phosphodiesterase from rat liver. *Biochem J* 234, 325-334

- Repaske DR, Corbin JG, Conti M, Goy MF (1993): A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* 56, 673-686
- Rivet-Bastide M, Vandecasteele G, Hatem S, Verde I, Bénardeau A, Mercadier JJ, Fischmeister R (1997): cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *J Clin Invest* 99, 2710-2718
- Robison GA, Butcher RW, Øye I, Morgan HE, Sutherland EW (1965): The effect of epinephrine on adenosine 3',5'-phosphate levels in the isolated perfused rat heart. *Mol Pharmacol* 1, 168-177
- Rosman GJ, Martins TJ, Sonnenburg WK, Beavo JA, Ferguson K, Loughney K (1997): Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 191, 89-95
- Russwurm C, Zoidl G, Koesling D, Russwurm M (2009): Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J Biol Chem* 284, 25782-25790
- Sadhu K, Hensley K, Florio VA, Wolda SL (1999): Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 47, 895-905
- Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA (2001): Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates  $\beta$ -adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *The FASEB Journal* 15, 1718-1726
- Shah AM, MacCarthy PA (2000): Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* 86, 49-86
- Shan X, Quaille MP, Monk JK, French B, Cappola TP, Margulies KB (2012): Differential expression of PDE5 in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Heart Fail* 5, 79-86
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998): Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8991-8996
- Sonnenburg Wk, Beavo JA (1991): Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. *J Biol Chem* 266, 17655-17661

Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, Surdo NC, Craig MA, Smith G, Hamilton G, et al. (2011): cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* 108, 929-939

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, et al. (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26, 1115-1140

Thompson WJ, Appleman MM (1971): Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochem* 10, 311-316

Tsai EJ, Kass DA (2009): Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Therapeut* 122, 216-238

Vettel C, Lämmle S, Ewens S, Cervirgen C, Emons J, Ongherth A, Dewenter M, Lindner D, Westermann D, Nikolaev V, Lutz S, Zimmermann W H, El-Armouche A (2014): PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, 1246-1252

Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, et al. (2010): Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest* 120, 617-626

Yang Q, Paskind M, Bolger G, Thompson WJ, Repaske DR, Cutler LS, Epstein PM (1994): A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1850-1858

Zaccolo M, Movsesian MA (2007): cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 100, 1569-1578

Zhang M, Kass DA (2011): Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol Sci* 32, 360-365

Zhang Q, Moalem J, Tse J, Scholz PM, Weiss HR (2005): Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling. *Eur J Pharmacol* 510, 209-215

Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, Fields LA, Mancuso L, Dodoni G, Stangherlin A, Livie C, Jiang H, Sin YY, et al. (2015): Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of cAMP regulated by phosphodiesterase 2. *Circ Res* 117, 707-719

## 7.1 Internetquellen

Statistisches Bundesamt (2012): Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2012, veröffentlicht auf

[https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle\\_n/EckdatenTU.html;jsessionid=1635D4B246F3354F2EDCF54439EB8FD4.cae2](https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle_n/EckdatenTU.html;jsessionid=1635D4B246F3354F2EDCF54439EB8FD4.cae2) (Webseite),

Statistisches Bundesamt Wiesbaden (24.02.2015, 20:30)

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ali-El Armouche für die Vergabe des interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas. Die hervorragende wissenschaftliche, aber auch im Besonderen die freundschaftliche Betreuung hat das Arbeiten in der Arbeitsgruppe immer angenehm gemacht.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Zimmermann für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen in seinem Institut und für die spannenden Diskussionen bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Katrin Wittköpper, Herrn Dr. rer. nat. Simon Lämmle und bei Frau Dr. rer. nat. Christiane Vettel für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei dem gesamten Team der Pharmakologie in Göttingen möchte ich mich für das tolle Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und das Engagement bedanken, besonders bei Roland Blume.

## **Lebenslauf**

Als zweites von vier Kindern bin ich, Julius Emons, verheiratet mit Ursula Emons, am 17.05.1985 in Eutin als Sohn der Eheleute Dr. med. Adelgund und Prof. Dr. med. Günter Emons geboren. Meine schulische Ausbildung habe ich 1992 in der Grundschule in Schönstadt begonnen. Im Juli 2005 legte ich das Abitur am Max-Planck-Gymnasium in Göttingen ab. Das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen absolvierte ich von 2006 bis 2013. Im Juni 2010 begann ich mit der Promotion: „Rolle der Phosphodiesterase 2 in der menschlichen und experimentellen Herzinsuffizienz“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen, Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. El-Armouche. Seit 2014 arbeite ich als Arzt in Weiterbildung und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Frauenklinik des Universitätsklinikums der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg bei Prof. Dr. med. Matthias W. Beckmann.



- El-Armouche A, Schwoerer AP, Neuber C, Emons J, Biermann D, Christalla T, Grundhoff A, Eschenhagen T, Zimmermann WH, Ehmke H (2010): Common microRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by changes in hemodynamic load. *Plos one* 5, e14263
- Wittköpper K, Emons J, El-Armouche A (2011): Febuxostat. *Deut Med Wochenschr* 136, 1270-1274
- Unsöld B, Schotola H, Jacobshagen C, Seidler T, Sossalla S, Emons J, Klede S, Knöll R, Guan K, El-Armouche A, Linke WA, Kögker H, Hasenfuss G (2012): Age-dependent changes in contractile function and passive elastic properties of myocardium from mice lacking muscle LIM protein (MLP) *Eur J Heart Fail* 14, 430-437
- Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittkopper K, Seppelt D, Dewenter M, Lutz S, Sossalla S, Maier LS, Lechene P, et al. (2013): Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 62, 1596-1606
- Vettel C, Lämmle S, Ewens S, Cervirgen C, Emons J, Ongherth A, Dewenter M, Lindner D, Westermann D, Nikolaev V, Lutz S, Zimmermann W H, El-Armouche A (2014): PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, 1246-1252
- Emons J, Heindl F, Hein A, Beckmann M.W (2016): Management operations- und karzinombedingter Blutungen. *Der Gynäkologe* 49, 24-28
- Schulz-Wendtland R, Harz M, Meier-Meitingner M, Brehm B, Wacker T, Hahn HK, Wagner F, Wittenberg T, Beckmann MW, Uder M, Fasching PA, Emons J (2016): Semi-automated delineation of breast cancer tumors and subsequent materialization using three-dimensional printing (rapid prototyping). *J Surg Oncol* [Epub ahead of print]