Die Rolle der Phosphodiesterase 2 im Herzen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades "Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)" im Studienprogramm Molekulare Medizin der Georg-August-Universität-Göttingen



vorgelegt von

Simon Lämmle geboren in Ludwigsburg

Göttingen 2014

MITGLIEDER DES BETREUUNGSAUSSCHUSSES (THESIS-KOMITEES)

BETREUER

Prof. Dr. med. Ali El-Armouche Zentrum Pharmakologie und Toxikologie sowie Herzforschungszentrum Göttingen Abteilung Pharmakologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen Robert-Koch-Str. 40 37075 Göttingen

Telefon: +49 551 39-22602 E-Mail: ali.el-armouche@med.uni-goettingen.de

ZWEITES MITGLIED

Dr. rer. nat. Viacheslav O. Nikolaev Herzforschungszentrum Göttingen Abteilung Kardiologie und Pneumologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen Robert-Koch-Str. 40 37075 Göttingen

Telefon: +49 551 39-10965 E-Mail: viacheslav.nikolaev@med.uni-goettingen.de

DRITTES MITGLIED

Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller Zentrum Pharmakologie und Toxikologie Institut für Klinische Pharmakologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen Robert-Koch-Str. 40 37075 Göttingen

Telefon: +49 551 39-5311 E-Mail: jbrockm@gwdg.de

MITGLIEDER DER PRÜFUNGSKOMISSION

REFERENT

Prof. Dr. med. Ali El-Armouche Zentrum Pharmakologie und Toxikologie sowie Herzforschungszentrum Göttingen Abteilung Pharmakologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen

KOREFERENT

Prof. Dr. mult. Thomas Meyer Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie Labor für Molekulare Psychokardiologie Georg-August-Universität Göttingen

WEITERE MITGLIEDER DER PRÜFUNGSKOMISSION

Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller Zentrum Pharmakologie und Toxikologie Institut für Klinische Pharmakologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz Zentrum Pharmakologie und Toxikologie sowie Herzforschungszentrum Göttingen Abteilung Pharmakologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen

PD Dr. rer. nat. Kaomei Guan-Schmidt Herzforschungszentrum Göttingen Abteilung Kardiologie und Pneumologie Medizinische Fakultät der Universität Göttingen Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung (Disputation): 14. November 2014

AFFIDAVIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel "Die Rolle der Phosphodiesterase 2 im Herzen" selbstständig angefertigt habe. Genutzte Hilfsmittel und Quellen wurden vollständig angegeben.

Göttingen, den 12.9.2014

Simon Lämmle

VERÖFFENTLICHUNGEN

Christiane Vettel^{*}, Simon Lämmle^{*}, Sebastian Ewens, Ceyhun Cevirgen, Julius Emons, Anita Ongherth, Matthias Dewenter, Diana Lindner, Dirk Westermann, Viacheslav Nikolaev, Susanne Lutz, Wolfram Zimmermann und Ali El-Armouche, *PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblasts to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways*. AJP: Heart and Circulatory Physiology. 2014;306(8):H1246–H1252. doi:10.1152/ajpheart.00852.2013.

* = gleichberechtigt (*"These authors contributed equally*") Siehe "VIII. Anhang"

KONGRESSTEILNAHMEN MIT POSTERPRÄSENTATION

A. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2011 in Frankfurt (31. März - 01. April 2011) Postertitel: *Phosphatase-inhibitor-1 activation is mediated via* β_2 *-adrenoceptors in cardiac fibroblasts* (Gemein-schaftsposter mit Sebastian Ewans)

B. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2012 in Dresden (19. März - 22. März 2012) Postertitel: *Phosphodiesterase 2A is upregulated in failing hearts and activates cardiac myofibroblast formation and CTGF synthesis via cGMP hydrolysis*

C. Basic-Science-Meeting 2012 in Hamburg (11. Oktober 2012) Postertitel: *Phosphodiesterase 2A is upregulated in failing hearts and activates cardiac myofibroblast formation and CTGF synthesis via cAMP hydrolysis*

D. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 2013 in Halle (05. März - 07. März 2013) Postertitel: *Phosphodiesterase 2A is upregulated in failing hearts and activates cardiac myofibroblast formation and CTGF synthesis via cAMP hydrolysis*

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	2
1.1 Das Herz	2
1.1.1. Anatomie und Physiologie	2
1.1.2. Biochemie und Pharmakologie	6
1.2. Herzinsuffizienz	9
1.2.1. Allgemeines	9
1.2.2. Symptomatik und Ursachen	9
1.2.3. Molekularbiologische Prozesse	10
1.2.4. Therapie	11
1.3. Phosphodiesterasen	13
1.3.1. Allgemeines	13
1.3.2. Phosphodiesterase Typ 2 (PDE2)	14
1.4. Transversale Aortenkonstriktion (TAC)	16
1.5. Echokardiographie	17
1.6. Langendorff-Perfusion	19
1.7. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	21
1.8. SDS-PAGE und Westerblot	22
1.9. Adenoviren	23
1.10. Transgene Mausmodelle	24
1.11. 3D-Gewebskulturen	26
1.12. Zielsetzung der Arbeit	26
II. Material & Methoden	27
2.1. Zellpräparation	27
2.1.1. Präparation neonataler Rattenzellen	27
2.1.2. Gewinnung adulter Kardiomyozyten	28
2.2. 2D-Zellkultur	28
2.2.1. Splitten und Kultivierung der Kardiofibroblasten	28
2.2.2. Kryokonservierung der Kardiofibroblasten	29
2.2.3. Adenovirale Infektion	29
2.2.4. Behandlung der Kardiofibroblasten mit Wirksubstanzen	29
2.3. 3D-Zellkultur	29
2.3.1. Konstruiertes Bindegewebe (ECT)	29
2.3.2. Konstruierter Herzmuskel (EHM)	
2.3.3. Herstellung Kollagen Typ I	30
2.3.4. Herstellung des Hühnerembryo-Extraktes (CEE)	31
2.4. Proteinbiochemie	31

.4. Proteinblochemie	
2.4.1. Lyse der Zellen	31

2.4.2. Lyse des Herzgewebes	31
2.4.3. Bradford-Messung	31
2.4.4. SDS-PAGE und Western-Blot	32
2.4.5. Fixierung der Zellen und Mikroskopie	32
2.4.6. Bestimmung des cAMP- und cGMP-Gehaltes	33
2.5. FRET-Messung	33
2.5.1. FRET-Messung	33
2.6. Transgene Techniken	33
2.6.1. Transgene Mäuse	33
2.6.2. Genotypisierung	34
2.7. Tierexperimentelle Techniken	34
2.7.1. Echokardiographie	34
2.7.2. TAC-Operation	35
2.7.3. Organentnahme und Bestimmung der biometrischen Parameter	35
2.7.4. Abbruchkriterien	35
2.8. Statistik	35
2.8.1. Statistische Auswertung	36
2.9. Verwendete Chemikalien, Substanzen und Antikörper	37
III. Ergebnisse	39
3.1. Funktion der PDE2 im kardialen Fibroblast	39
3.1.1. Vergleich der PDE2-Expressionsmuster im kardialen Myozyten und Fibroblasten	39
3.1.2. Lokalisierung der kardialen PDE2 im Fibroblast	39
3.1.3. Basale cAMP-Konz. und profibr. Faktoren bei kardialer PDE2-Überexpression	40
3.1.4. Auswirkungen der PDE2-Überexpression auf die Steifheit von ECTs	42
3.1.5. Einfluss einer zusätzlichen beta-adrenergen Stimulation	42
3.1.6. Einfluss einer zusätzlichen Guanylatzyklase-Aktivierung	45
3.2. Funktion der PDE2 im kardialen Myozyten	47
3.2.1. PDE2 im Konstruierten Herzmuskel	47
3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt	47
3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus	47 49
3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus 3.3.1. Expressionsstärke der PDE2A3-transgenen Linie	47 49 51
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus 3.3.1. Expressionsstärke der PDE2A3-transgenen Linie 3.3.2. Basalcharakterisierung der transgenen Mauslinie 	47 49 51 51
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus 3.3.1. Expressionsstärke der PDE2A3-transgenen Linie 3.3.2. Basalcharakterisierung der transgenen Mauslinie 3.3.3. Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mauslinie	47 49 51 51 51
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus 3.3.1. Expressionsstärke der PDE2A3-transgenen Linie 3.3.2. Basalcharakterisierung der transgenen Mauslinie 3.3.3. Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mauslinie	47 49 51 51 51 55
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt 3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus	47 49 51 51 51 55 57
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt	47 51 51 51 55 57
 3.2.2. PDE2 im adulten Kardiomyozyt	47 49 51 51 55 57 61

4.2.1. Konstruierter Herzmuskel (EHM)	62
4.2.2. Isolierter adulter Kardiomyozyt	63
4.2.3. PDE2A3-transgene Maus	64
4.3. Die Rolle der PDE2 im Herzen	68
V. Danksagungen	70
VI. Literaturverzeichnis	72
VII. Abkürzungen	80
VIII. Anhang	82

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - Anatomie des Herzens und des Erregungsleitungssystems	3
Abbildung 2 - Vereinfachte Schematik der verschiedenen Phasen des Herzzyklus	3
Abbildung 3 - Überblick über biochemische Signalwege	5
Abbildung 4 - Gegensätzliche Regulation der PDE2/3 durch cGMP	15
Abbildung 5 - Proteinmodell des PDE2-Dimers auf Basis der Röntgenkristallstruktur	15
Abbildung 6 - Schema des TAC-Modells bei der Maus	17
Abbildung 7 - Schematischer Aufbau der vereinfachten Langendorff-Apparatur	20
Abbildung 8 - Funktionsweise des EPAC2-Biosensors auf cAMP	21
Abbildung 9 - Sequenz des für den Ad-PDE2A3 verwendete linearisierte Konstrukt	29
Abbildung 10 - Plasmid α MHC-PDE2A3	33
Abbildung 11 - Kardiale PDE2-Expression in NRCF und NRCM	39
Abbildung 12 - Lokalisierung der rekombinanten PDE2 im NRCF	40
Abbildung 13 - cAMP-Konzentration und profibrotische Faktoren	41
Abbildung 14 - Bilder durch Immunfluoreszenz der α -SMA- und CTGF-Expression	41
Abbildung 15 - ECTs mit Ad-PDE2	43
Abbildung 16 - Effekt von ISO auf den cAMP-Spiegel und die profibrotischen Faktoren	44
Abbildung 17 - Schematischer Überblick der gefundenen Ergebnisse in NRCF	45
Abbildung 18 - Effekt von ANP und SNP auf den cGMP-Spiegel und die profibr. Faktoren	46
Abbildung 19 - Vergleich der absoluten und relativen Kontraktionskraft	48
Abbildung 20 - Blot der adulten Mauskardiomyozyten (AMCM) auf PDE2	49
Abbildung 21 - Selektive Aktivierung des β_1/β_2 -AR	50
Abbildung 22 - Effekt einer cGMP-Stimulation auf den cAMP-Spiegel	51
Abbildung 23 - Charakterisierung der transgenen Mauslinie	52
Abbildung 24 - Kardialer PDE2-Expressionslevel der transgenen Mauslinie	53
Abbildung 25 - Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mäuse - A	54
Abbildung 26 - Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mäuse - B	55
Abbildung 27 - Graphische Darstellung der Werte des Alterungsexperiments	56
Abbildung 28 - Stenosegradienten der TAC-Tiere	58
Abbildung 29 - Graphische Darstellung des TAC-Experiments	59
Abbildung 30 - Vergleich zwischen Tieren mit und ohne TAC-OP	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 - Gebrauchschemikalien	37
Tabelle 2 - Feinchemikalien	38
Tabelle 3 - Antikörper	38
Tabelle 4 - Medien und Lösungen für Zellkultur	38

Die Rolle der Phosphodiesterase 2 im Herzen

Universitätsmedizin Göttingen, Institut für Pharmakologie, Göttingen

Herzinsuffizienz ist ein weltweites Gesundheitsproblem mit hoher Morbidität und Mortalität und immer noch schlechter Prognose. Ein charakteristisches Merkmal der molekularen und damit verbundenen strukturellen Veränderungen, die der terminalen Insuffizienz vorangehen ist die durch Desensitivierungsmechanismen vermittelte Abnahme des beta-adrenergen (β -AR) Signalmoleküls zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) auf der einen Seite und der gleichzeitigen Zunahme des von natriuretischen Peptiden (NP) und Stickstoffmonoxid (NO) generierten zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) auf der anderen Seite. Während hohe cAMP-Spiegel im Herzen als schädlich gelten, werden cGMP-abhängige Signalkaskaden vorwiegend als protektiv verstanden. Amplitude, Lokalisation und Halbwertszeit beider Signalmoleküle werden durch spezifische Enzyme, den Phosphodiesterasen (PDE) reguliert. Unter der PDE-Superfamilie wird die Isoform PDE2 als einzige von cGMP aktiviert, um dann verstärkt cAMP abzubauen und steht damit im Zentrum eines negativen *Crosstalks* dieser beiden Signalwege. PDE2 ist sowohl in der humanen als auch der experimentellen Herzinsuffizienz hochreguliert und scheint dort am β -AR Desensitivierungsprozess beteiligt zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die pathophysiologische Rolle der PDE2 im Herzen näher charakterisiert.

Es wird gezeigt, dass die PDE2 nicht nur in Kardiomyozyten, sondern auch in kardialen Fibroblasten exprimiert wird. In Fibroblasten inhibieren cAMP/cGMP-Signalwege die Transformation von kardialen Fibroblasten (CF) zu Myofibroblasten (MyoCF), einem zellulären Phänotyp, der unter anderem mit der persistenten Fibrotisierung des erkrankten Herzgewebes in Verbindung gebracht wird. In CF führte eine Überexpression von PDE2 zu eine starken Abnahme der basalen und β_2 -AR-vermittelten cAMP-Synthese und war ausreichend, um in Abwesenheit exogener, pro-fibrotischer Stimuli die Transformation zum MyoCF zu induzieren. In Übereinstimmung zeigten funktionale Analysen mit künstlich hergestelltem Bindegewebe aus PDE2-überexprimierenden CF eine deutliche Zunahme der Gewebssteifigkeit. PDE2 übte keinen Einfluss auf basale oder durch das atriale NP generiertes cGMP aus und reduzierte nur partiell die NO-induzierte cGMP-Akkumulation. Interessanterweise waren beide Stimuli in der Lage, trotz niedriger cAMP-Spiegel die PDE2-induzierte CF-Transformation zum MyoCF zu verhindern und lassen daher eine Redundanz dieser beiden sonst so gegensätzlichen Signalwege vermuten.

Zur Untersuchung von PDE2 in Kardiomyozyten wurde ein transgenes (TG) Mausmodell mit spezifischer kardialer Überexpression herangezogen. Die Basalcharakterisierung zeigte eine erniedrigte Herzfrequenz (HR) mit kompensatorisch erhöhter, basaler Kontraktionskraft, sowie eine verminderte Maximalantwort bezüglich der HR nach akuter β -AR Stimulation. Auf molekularer Ebene war dieser Phänotyp mit einer verminderten Phosphorylierung verschiedener β -AR Zielstrukturen wie Troponin I, Phospholamban und Ryanodinrezeptor-2 assoziiert. Langzeitstudien belegten, dass eine Überexpression von PDE2 keine pathologischen Konsequenzen hat, sondern im Gegenteil die durchschnittliche Lebensspanne der Tiere eher verlängerte. Erste Studien im Herzinsuffizienzmodel der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) zeigten bisher eine beständig erniedrigte HR und verminderte Wanddicken bei allerdings vergleichbarer Abnahme der kardialen Kontraktionskraft.

Trotz der klaren Befunde und neuen Erkenntnisse über die vielfältige Rolle der PDE2 im Herzen lässt sich bisher noch nicht klar belegen, ob eine zusätzliche Aktivierung von myokardialen PDE2 tatsächlich im Sinne einer intrazellulären β -AR-Blockade die Progression zur Herzinsuffizienz verlangsamen oder verhindern könnte. Weitere darauf aufbauende Untersuchungen, wie z.B. eine akut induzierbare Aktivierung bzw. Deaktivierung in experimentellen Herzinsuffizienzmodellen könnten den Weg für die Entwicklung klinisch anwendbarer Ansätze zur therapeutischen Modulation dieser viel versprechenden Zielstruktur ebnen.

The role of phosphodiesterase 2 in the heart

University Medical Center Göttingen, Institute of Pharmacology Göttingen

Heart failure is a worldwide health issue with high morbidity and mortality rates and always a poor prognostic outlook. A characteristic element of the molecular driven structural transformation, which precedes the terminal failure, is on one hand the reduction of the beta-adrenergic signal molecule cyclic adenosine monophosphate (cAMP), caused by a desensitization process, and on the other hand the increase of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), triggered from natriuretic peptides (NP) and nitrogen monoxide (NO). Whereas high cAMP levels are known to be detrimental to the heart, cGMP-dependent signal cascades are seen as heart protective. Amplitude, localization and half life of both signal molecules are regulated by specific enzymes, called Phosphodiesterases (PDE). PDE2 is the only known isoform in this PDE superfamily that gets activated from cGMP and then degrades cAMP at a higher rate and is therefore a centerpiece of a negative crosstalk between both signal pathways. PDE2 is found to be upregulated in human and experimental heart failure and may therefore be part of the beta-adrenergic deactivation process. In the context of this thesis we therefore had a closer look at the pathophysiological role of PDE2 in the heart.

It was shown, PDE2 is expressed in cardiac myocytes as well in cardiac fibroblasts. In cardiac fibroblasts cAMP/cGMP signaling is inhibiting fibroblast (CF) transformation into myofibroblasts (MyoCF), a cellular phenotype that is related to the fibrotic remodeling of the diseased heart. In CF, a PDE2 overexpression caused a decrease of basal β_2 -adrenergic induced cAMP synthesis and was sufficient to induce the MyoCF transformation, even in the absence of exogenic, pro-fibrotic stimuli. In accordance, functional analysis of engineered connective tissue (ECT) of PDE2 overexpressing CF showed an increase in tissue stiffness. No PDE2 effect on basal or atrial NP induced cGMP was found, and PDE2 reduced only partially the NO-induced accumulation of cGMP. Interestingly, both stimuli are able to block the PDE2-induced CF transformation despite low cAMP levels. Therefore, there could be a redundancy of both, normally contrary, signal pathways.

To investigate the role of PDE2 in cardiac myocytes, a transgenic (TG) mouse model with heart specific PDE2 overexpression was used. Basal characterization showed a lower heart rate (HR) and compensatory increased contractile force, and a reduced maximal response of HR after acute beta-adrenergic stimulation. On the molecular level, this phenotype showed a reduced phosphorylation of beta-adrenergic targets, like Troponin I, Phospholamban and Ryanodine receptor 2. Long time studies were able to prove, that there are no pathological consequences from a PDE2 overexpression, but rather an increased lifespan. Initial studies with the heart insufficiency model transverse aortic constriction (TAC) showed a robust decreased heart rate and reduced wall thickness, albeit similar reduction in cardiac contractile force.

Despite these clear findings and new insights in the diverse role of PDE2 in the heart, it is still not fully elucidated weather an additional activation of PDE2 is able to decelerate or prevent the progression of heart failure by intracellular beta-adrenergic blockade. Subsequent studies, such as an acute induced activation or deactivation in experimental heart failure models, could pave the way for clinical applications for therapeutic modulation of this promising target.

I. EINLEITUNG

1.1 Das Herz

1.1.1. ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE

Einer der wichtigsten Muskeln des menschlichen Körpers ist das Herz. Es stellt ein muskuläres Hohlorgan dar, ist das zentrale Organ des Blutkreislaufs der meisten Tiere (außer bei Nesseltieren und Schwämmen) und macht bei Säugern rund 0,5 % des Körpergewichtes aus. Im Mittelalter betrachtete man das Herz als Zentrum der Gefühle, was sich bis heute in Metaphern wie "herzlos sein", "Herz aus Stein bzw. Gold haben", "von Herzen kommen" usw. widerspiegelt. Heutzutage versteht man die Bedeutung und Funktionsweise dieses Muskels besser. Bei Muskeln unterscheidet man grob zwischen glatter Muskulatur, die sich nicht willentlich bewegen lässt und kontraktiles Gewebe von Blutgefäßen und Hohlorganen darstellt, und zwischen quergestreiften Muskeln, die sich willentlich bewegen lassen. Eine Ausnahme stellt hier der Herzmuskel dar, er vereinigt Merkmale beider Muskeltypen. Grundsätzlich besteht er aus quergestreiften Muskelfasern bei denen die einzelnen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) jedoch durch Zell-Zell-Kanäle (sog. "Gap Junctions") zu einem sog. "funktionellen Synzytium" elektrisch verbunden sind. Die Gap Junctions finden sich alle in den Bereichen zwischen den einzelnen Kardiomyozyten. Dieser Bereich wird auch als Glanzstreifen bezeichnet.

Das Herz teilt sich grob in zwei Hälften, die rechte Hälfte mit rechtem Vorhof (Atrium) und rechter Herzkammer (Ventrikel) und dem linken Teil mit linkem Atrium und linkem Ventrikel (Abb. 1). Im Ventrikel findet man kleine Muskelbälkchen, die Trabekel, die zu einer Verwirbelungen des ventrikulären Blutstrom führen und diesen so abdämpfen sollen.

Das Blut gelangt aus dem Körper über die untere und obere Hohlvene (*Vena cava superior*, *V. c. inferior*) in den rechten Vorhof des Herzens. Die Aorta ist mit der linken Herzkammer verbunden und führt das Blut aus dem Herzen in den Blutkreislauf zurück. Das Herz selbst wird über die Herzkranzgefäße mit Blut versorgt. Für die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufs ist die Pumpfunktion des Herzens zuständig, sie besteht aus einer rhythmischen Abfolge aus Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) des Myokards. Außerdem unterscheidet man in der Systole zwischen Anspannungs- und Austreibungsphase und in der Diastole zwischen Entspannungs- und Füllungsphase (Abb. 2). Der Kehrwert der Dauer von Diastole + Systole wird als Herzfrequenz bezeichnet und in Schlägen pro Minute ausgedrückt (z.B. Systole 0,25 sec. + Diastole 0,15 sec. = Herzfrequenz von 150 bpm). Der Druck in den Ventrikeln und Atrien bei jeder Systole entsteht durch die Anspannung der Herzwandmuskeln (Wandspannung). Wichtig für die Funktion des Herzens sind außerdem die Herzklappen an den Ein- und Ausgängen der Ventrikel. Man unterscheidet hier die Atrioventrikularklappen (AV-Klappen, zwischen Vorhöfen und Kammern) und Aortenbzw. Pulmonalklappen (Taschenklappen, verhindern bei der Diastole einen Rückstrom des Blutes). Während der Austreibungsphase wird das Schlagvolumen (SV) aus dem Herzen gepresst, jedoch nicht das gesamte Blut, das sich während der Füllungsphase im Herzen angefüllt hat. Es bleibt ein Anteil davon zurück. Das Verhältnis zwischen enddiastolischem Volumen (EDV) zum SV bezeichnet man als Auswurffraktion (EF, EF = SV/EDV). Bei der darauf folgenden Erschlaffungsphase verringert sich der intraventrikuläre Druck, so dass sich die AV-Klappen öffnen und die Füllungsphase beginnen kann (Abb. 2).

Die Größe des Herzens ist ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung des Drucks. Hier gilt die Laplace-Beziehung nach $p = K^*(2d/r)$, wobei p = transmuraler Druck in Pa, K = Wandspannung = Kraft pro Wandquerschnitt, r = Radius, d = Wanddicke). Aus dieser Beziehung ergibt sich, dass ein Herz am besten den nötigen Druck aufbauen kann, wenn es entweder klein und / oder dickwandig ist. Schlecht für die Pumpleistung ist somit ein großes und / oder dünnwandiges Herz.

Damit sich im Kreislauf weder Stauungen noch ein Leerpumpen ereignen, müssen die Pumpvo-



ABBILDUNG 1 • Anatomie des Herzens und des Erregungsleitungssystems. RA = Rechtes Atrium, RV = Rechter Ventrikel, LV = Linker Ventrikel, Vcs = Vena cava superior. Illustration aus "Heart Pro III", 3D4Medical Apps.



ABBILDUNG 2 • Vereinfachte Schematik der verschiedenen Phasen des Herzzyklus. Anspannungs- und Austreibungsphase stellen die Systole dar, Füllungs- und Entspannungsphase die Diastole. A = Atrium, V = Ventrikel. lumina beider Herzkammern aufeinander abgestimmt sein. Dies erfolgt über einen Mechanismus der nach seinen Erstbeschreibern Otto Frank und Ernest Starling als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet wird. Eine andere nützliche Funktion dieses Mechanismus ist eine Anpassung des SV an veränderte Aortendrücke (Afterload, akute Druckbelastung) oder veränderte Füllungen (Preload, akute Volumenbelastung) durch eine Regulation des Schlagvolumens des linken Ventrikels. Werden die Muskelfasern des Herzens durch eine akute Volumenbelastung stark gedehnt, sind sie in der Lage mehr Kraft zu entwickeln und somit auch ein größeres Volumen wieder auszuwerfen. Ist im Gegenzug durch einen erhöhten Aortendruck eine höhere Kontraktionskraft während der Auswurfphase nötig, dann verringert sich das ausgeworfene Blutvolumen und es bleibt mehr Blut im Herzen zurück. Beim nächsten Auswurf kommt es daher wieder zu einer Volumenbelastung. Somit kommt es zu einer von äußeren Signalen unabhängigen Regulation des Schlagvolumens.

Jedes Lebewesen hat seine eigene Herzfrequenz, die je nach Alter bzw. Belastung variiert. Reguliert wird die Herzfrequenz durch die Schrittmacherzentren des Herzens, den Sinusknoten, den Atrioventrikular-(AV)-Knoten, die His-Bündel und die Purkinje-Fasern (gegliedert nach abnehmender Eigenfrequenz).

Der primäre Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten (SAN) im oberen Teil des rechten Vorhofs. Er sorgt für den sogenannten Sinusrhythmus und besteht aus spezialisierten Myozyten. Vom Sinusknoten wird der Reiz zum AV-Knoten weitergeleitet und gelangt von dort über die His-Bündel und die zwei Tawara-Schenkel zu den Purkinje-Fasern (Abb. 1). Die Purkinje-Fasern ziehen netzwerkartig durch den rechten und linken Ventrikel (Abb. 1). Die anderen Schrittmacherzentren besitzen auch eine Eigenfrequenz, die jedoch durch die höhere Eigenfrequenz des Sinusknoten überlagert wird und daher im Normalfall nicht zum Tragen kommt. In den Zellen des Sinusknoten (SAN) existiert kein

stabiles Ruhemembranpotential, wie z.B. bei ventri-

kulären Kardiomyozyten. Das negativste Potential, welches sich während der Diastole einstellt, wird als maximales diastolisches Potential (MDP) (ca. -60 mV) bezeichnet. Es kommt zum Großteil durch den Konzentrationsunterschied an Kaliumionen zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum und durch eine repolarisierende K⁺-Leitfähigkeit zustande.

Der autonome Rhythmus des Sinusknoten (Sinusrhythmus) kommt nach heutigem Kenntnisstand durch die Kopplung zweier Oszillatoren zustande. Dies wird auch als die "Theorie der gekoppelten Uhren" bezeichnet (Yaniv 2014). Der erste Oszillator ist die sogenannte Membran-Uhr ("membrane clock"), eine komplexe Interaktion zwischen Strömen verschiedener spannungsgesteuerter Ionenkanäle in der Oberflächenmembran der SAN-Zellen. Nach dieser Hypothese kontrolliert die Kinetik aus Aktivierung und Inaktivierung der Membrankanäle den zeitlichen Ablauf, welche die Membran-Uhr ausmacht (Dobrev 2009). Ausgehend vom MDP kommt es durch die Aktivierung von hyperpolarisationsaktivierten Zyklonukleotid-gesteuerten Kationenkanälen (HCN-Kanäle), die dem sogenannte funny current (I_c) zugrunde liegen, zu einer Depolarisation. HCN-Kanäle sind unspezifische Kationenkanäle, die aufgrund der Lage des elektrochemischen Gradienten in dieser Erregungsphase vor allem Na⁺ in die Zelle leiten. Durch diese Depolarisation (diastolische Depolarisation, DD) öffnen sich spannungsgesteuerte Ca2+-Kanäle (L- und T-Typ) und es kommt zu einem Aufstrich des AP, sobald genügend L-Typ-Kanäle (LTCC) geöffnet sind. Diese spontane Depolarisation wird durch eine spannungsabhängig verminderte K+-Leitfähigkeit der Membran begünstigt.

Der zweite Oszillator ist die von Lakatta *et al.* postulierte Kalzium-Uhr ("*calcium clock*") (Lakatta 2010). Lakatta *et al.* konnten zeigen, dass es über Ryanodin-Rezeptoren (RyR₂) während der späten DD zu einem lokalen Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR kommt. Diese Ca²⁺-Ausschüttung aus dem SR tritt entweder spontan auf oder als Antwort auf eine Aktivierung der T-Typ Ca²⁺-Kanäle. Der Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR aktiviert hierbei den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) und erzeugt hierüber einen depolarisieren-



ABBILDUNG 3 - Überblick über biochemische Signalwege der β-adrenergen Stimulation, der Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion, Aktivierung der Guanylatzyklasen durch ANP/NO, Angiotensin II- und TGF-β-Wirkung und die Rolle der PDE2 im Kardiomyozyten. Erstellt nach (Bernardo 2010), (Berridge 2003), (Bers 2002), (El-Armouche 2006), (Gusterson 2002), (Ke 2008), (Liew 2004), (Lindsay 2011), (McMullen 2007), (Shimokawa 2007), (Tamargo 2011) und (Wittköpper 2011).

Bemerkung: Aufgrund der Komplexität von Signalkaskaden ist es hier nicht möglich alle Interaktionen zu zeigen.

den Na⁺-Einwärtsstrom. Dieser bringt die späte DD zur Aktivierungsschwelle der Erzeugung des AP von rund -40 mV. Unter Sympathikus-Aktivierung kommt es zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, indem die DD steiler ausfällt und somit der Schwellenwert schneller erreicht wird.

Man unterscheidet das Aktionspotential der Schrittmacher von dem der Zellen des Arbeitsmyokards. Im Arbeitsmyokard kommt es, ausgelöst durch elektrische Reize der benachbarten Kardiomyozyten, zu einem Na⁺-Einstrom durch spannungsaktivierte Na⁺-Kanäle in die Zelle, und so zur Depolarisation. Die Na⁺-Kanäle schließen von selbst wieder. Durch die Depolarisation öffnen sich langsam L-Typ Ca²⁺-Kanäle und Ca²⁺ strömt in die Zelle. Dies führt zu einer Depolarisation des Potentials auf etwa +30 mV und wird auch als "Plateauphase" bezeichnet. Einige K⁺-Kanäle, die schon durch die vorherige Depolarisation aktiviert wurden, fördern K⁺ aus der Zelle und sorgen so für ein relativ stabiles Potential für etwa 200 ms. In dieser Refrakterperiode kann die Zelle auf keinen neuen Reiz reagieren, bis sich die K⁺-Kanäle langsam von selbst wieder schließen. Die AP-Dauer reduziert sich mit steigender Herzfrequenz. Da nun nur noch K⁺ aus der Zelle strömt, sinkt das Potential wieder und erreicht das Niveau des Ruhepotentials (Repolarisation). Das gesamte ventrikuläre AP dauert am menschlichen Herzen je nach Herzfrequenz ungefähr 200 - 350 ms. Die Na+/ K+-Pumpe sorgt für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Na⁺/K⁺-Konzentration. Die Erregung breitet sich über Zell-Zell-Kanäle benachbarter Zellen (Gap Junctions) wellenartig vom Sinusknoten bis zur Herzspitze über das gesamte Herz aus.

Eine Anpassung des Herzschlags (Chronotropie) an die jeweils gegebene Situation (Ruhe, Stress...) gelingt dem Herzens über das neurohumorale System. In Ruhe wird der Herzschlag über Acetylcholinausschüttung durch Aktivierung des Parasympathikus u.a. über Öffnung von K⁺-Kanälen in den Schrittmacherzellen gedämpft (negative Chronotropie). Bei Bedarf (Anspannung, Fluchtsituation, Stress...) wird er über die Ausschüttung von Noradrenalin über sympathische Aktivierung beschleunigt, ausgelöst durch das Schließen von K⁺-Kanälen, den Einstrom von K⁺ und die Aktivierung von HCN-Kanälen (positive Chronotropie). Unter sympathischer Aktivierung kommt es außerdem zu einer positiven ionotropen Wirkung des Myokards (Erhöhung der Schlagkraft).

Herzgewebe besteht aus einer ganzen Reihe an unterschiedlichen Zelltypen, als Hauptkomponenten wären hier Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten zu nennen. Rund zwei Drittel der Zellen des Herzens sind dabei Kardiofibroblasten (Swaney 2005), die Kardiomyozyten kommen hier nur auf rund 30 - 40 %, tragen aber zu 75 % zum Volumen des Myokards bei (Camelliti 2005). Die Kardiomyozyten sind hierbei die Muskelzellen des Herzen, die entscheidend sind für die Kontraktion. Die Fibroblasten stellen Zellen des Bindegewebes dar, geben Stoffe, wie das Strukturprotein Kollagen, ab und sind beteiligt an der Bildung von Fibrose und der Reparatur von Verletzungen (Narbenbildung).

Die Differenzierung des Säugetierherzens während der Entwicklung ist ein komplizierter Prozess. Dabei entwickelt sich das Herz aus einem primitiven Herzschlauch, gesteuert durch verschiedene Faktoren, wie Homöobox-Protein Nkx-2.5, Knochenmorphogenetische Proteine (BMP), GA-TA-Transkriptionsfaktoren und Transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF- β), zu einem ausdifferenzierten Herzen (Srivastava 2000). Die Fibroblasten gehen dabei aus mesenchymalen Stammzellen oder Fibrozyten hervor, die Kardiomyozyten aus mesodermalen Stammzellen. Nach der Geburt unterscheidet man zwischen neonatalen Fibroblasten bzw. Kardiomyozyten (bei Mäusen jünger als 10 Tage) und adulten. Die neonatalen Kardiomyozyten sind noch nicht komplett ausdifferenziert. Adulte Kardiomyozyten hingegen zeigen die typische Form und typische quergestreifte Natur.

1.1.2. BIOCHEMIE UND PHARMAKOLOGIE

Wie schon erwähnt, erhöht sich die Herzfrequenz bei sympathischer Aktivierung. Die sympathische Aktivierung ist ein mehrstufiger Prozess (Abb. 3). Im ersten Schritt binden die freigesetzten Katecholamine (vor allem Noradrenalin) an β_1 -Adrenozeptoren (β_1 -AR) an der Zellmembran. Dies aktiviert über einen G-Protein-abhängigen Prozess das Enzym Adenylatzyklase (AC) welches Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. G-Proteine sind GTP-bindende Proteine. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten α , β und y. Der Komplex wird durch Austausch des an die α-Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP aktiviert. Ein pharmakologischer Aktivator der AC ist das vom Labdan abgeleitete Diterpen Forskolin, welches aus Plectranthus barbatus isoliert werden kann (Kavitha 2010). Das Signalmolekül cAMP aktiviert unter anderem die Proteinkinase A (PKA). Die aktivierte PKA phosphoryliert eine ganze Reihe anderer Proteine, was bei diesen zu einer Aktivierung oder Inaktivierung führt (Abb. 3). So führt die Phosphorylierung des L-Typ Ca²⁺-Kanals (LTCC) zu einem Einstrom von Ca2+ in die Zelle (Tamargo 2011). Die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors 2 (RyR2) verstärkt den Ausstrom von Ca2+ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol (Tamargo 2011, Bers 2002) und verstärkt somit die Kontraktion. Die Ryanodin-Rezeptoren haben ihren Namen, durch die spezifische Bindung des giftigen Alkaloids Ryanodin aus der südamerikanischen Pflanze Ryania speciosa. Phospholamban (PLB) hemmt die Ca²⁺ ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), welche durch eine Phosphorylierung aufgehoben wird. Im gesunden Kardiomyozyt dominiert im SR die Isoform SER-CA2A (Dally 2010). SERCA2A befördert das Ca2+, das während einer Kontraktion ins Zytosol ausgeschüttet wurde, wieder zurück in das SR. Hierdurch kommt es zu einer Relaxation. Eine erhöhte Aktivität der SERCA2A führt dazu, dass das Ca2+ schneller wieder in das SR abtransportiert werden kann und hat somit kürzere Intervalle zwischen den einzelnen Kontraktionen zur Folge, sprich eine schnellere Relaxation (positive Lusitropie). Außerdem führt eine erhöhte SERCA2A-Aktivität zu mehr verfügbarem Ca²⁺ im SR. Somit kann bei jedem AP auch mehr Ca²⁺ freigesetzt werden, was zu einer Erhöhung der

Kontraktion führt (positive Inotropie). Der Effekt des (unphosphorylierten) PLB ist es somit, die Kontraktilität und die Rate der Muskelrelaxation zu erniedrigen, was zu ebenfalls erniedrigtem Schlagvolumen und Herzfrequenz führt. Man unterscheidet zwischen einer Phoshorylierung des PLB durch die PKA an Ser16 und einer durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) an Thr17. Im SR liegt das Ca²⁺ an Calsquestrin (CSQ) gebunden vor (Liew 2004), im Myozyt kommt die Isoform CSQ2 vor. 1 Mol CSQ2 kann hierbei ca. 40 - 50 Mol Ca²⁺ binden (Gaburjakova 2012). Im Sarkomer führt PKA zu einer Phosphorylierung von kardialem Troponin I (cTnI) und kardialem Myosinbindeprotein C (cMyBP-C), was das Maß von Kraftentwicklung und Relaxation des Myokards beeinflusst (Ke 2008). Außerdem aktiviert die PKA den Proteinphosphataseinhibitor-1 (I-1) durch Phosphorylierung, welcher seinerseits die dephosphorylierende Wirkung der Proteinphosphatase 1A (PP-1A) hemmt (Wittköpper 2011). cAMP steigert außerdem, über Bindung an den HCN-Kanal, die Herzfrequenz.

Aktivierung der membrangebundenen Guanylatzyklase (GC-A) durch Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) oder B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) oder der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Stickstoffmonoxid (NO) führt zu einer Bildung von cGMP, welches die Proteinkinase G (PKG) aktiviert. Dies führt u.a. ebenfalls zu einer PLB-Phosphorylierung (Gorbe 2010).

Angiotensin II im Blut aktiviert Angiotensinrezeptoren (ATR) im Kardiomyozyten. Der aktivierte AT1R führt über eine G-Protein-abhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zum einen zu einem Ca²⁺-Ausstrom über den Inositoltrisphosphatrezeptor (IP₃R) aus dem SR und zum anderen über eine Phosphorylierung der Extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) bzw. SMAD2/3 (*Mothers against decapentaplegic homolog*) zur Aktivierung der Apoptose, bei z.B. dilatativer Kardiomyopathie, bzw. der pathologischen Hypertrophie bei pathologischer Mehrbelastung des Herzens (Lindsay 2011, Tamargo 2011). Eine pathologische Hypertrophie wird ebenfalls induziert durch Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges (Ber-

nardo 2010).

Die Schlagkraft des Herzens beeinflusst auch den Blutdruck. Man unterscheidet hier den systolischen und diastolischen Blutdruck. Der systolische Blutdruck ist der Druck, den das Blut während der Systole auf die Gefäßwände ausübt. Er wird somit u.a. vom Schlagvolumen des linken Herzens und der Dehnbarkeit der Gefäße bestimmt. Wohingegen der diastolische Blutdruck durch den Restdruck der Gefäße während der Diastole entsteht.

Der Blutdruck wird über Barorezeptoren im juxtaglomerulären Apparat der Niere gemessen. Fällt dieser ab, wird hier das Enzym Renin ins Blut abgegeben. Renin trifft im Blut auf das Prohormon Angiotensinogen und spaltet es zu Angiotensin I (Ang I). Ang I wird dann durch Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) aus (hauptsächlich) Endothelzellen der Lunge in das aktive Angiotensin II (Ang II) umgewandelt. ACE baut außerdem Bradykinin ab, ein Hormon mit gefäßerweiternder Wirkung. Ang II bindet an AT1-Rezeptoren im Herzen, der Niere und den glatten Gefäßmuskeln und führt im Herzen über eine gesteigerte Kalziumausschüttung zu einer Zunahme der Schlagkraft (Abb. 3). Außerdem führt die Aktivierung des AT1-Rezeptors zu einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskeln. In der Nebennierenrinde führt die Aktivierung der AT1-Rezeptoren zur Ausschüttung von Aldosteron. Aldosteron ist ein Steroidhormon, das zu einer Wasser- und NaCl-Rückresorption in der Niere und einer erhöhten Ausscheidung von K+ führt. Dies alles bedingt einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks durch Erhöhung des Extrazellularvolumens.

Bei einer erhöhten Volumenbelastung (Vorlast), kommt es am Ende der Diastole zu einer erhöhten Dehnung der kontraktilen Muskelfasern des Herzens. Steigt die Dehnung des Atriums aufgrund dieser erhöhten Volumenbelastung an, führt dies zu einer Freisetzung von Atrialem Natriuretischem Peptid (ANP). Im Ventrikel wird bei erhöhter Dehnung vor allem B-Typ Natriuretisches Peptid (BNP) freigesetzt. Diese Peptide greifen in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ein, welches für die Regulation des Blutdrucks und des Wasser- bzw. Salzgehalts des Blutes mit verantwortlich ist. ANP und BNP sorgen für eine Hemmung der Aldosteron-Synthese und der Renin-Sekretion und wirken somit einem Anstieg des Blutdrucks durch das RAAS entgegen (Nishikimi 2006).

Ebenfalls an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist das C-Typ Natriuretische Peptid (CNP). Es wird vor allem aus Endothelzellen und ventrikulären Kardiomyozyten freigesetzt und beeinflusst, über Bindung an den Rezeptor GC-B und darauf folgende cGMP-Produktion, den Gefäßtonus (Tokudome 2004).

Eine weitere Autoregulationsmöglichkeit des Herzens ergibt sich aus dem nach seinem Entdecker benannten Bowditch-Effekt. Hierbei erhöht sich bei steigender Herzfrequenz auch die Schlagkraft des Herzens. Man erklärt dies mit einer höheren K⁺-Konzentration bei erhöhter Herzfrequenz. Bei einer Erhöhung der Herzfrequenz kommt es in den SAN-Zellen zu einer Erhöhung des Na⁺-Einstroms über die HCN- und NCX-Kanäle. Diese erhöhte Na⁺-Konzentration aktiviert die Na⁺/K⁺-ATPase. Iedoch ist der Na⁺-Einstrom höher als der Na⁺-Ausstrom, was den NCX-Kanal in seiner Funktion hemmt und somit die Ca2+-Konzentration in der Zelle ansteigen lässt. Diese erhöhte K+-Konzentration steigert die Kontraktionskraft des Herzmuskels (Lakatta 1999). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist dieser Mechanismus gestört und eine Erhöhung der Herzfrequenz kann sogar zu einer Verminderung der Schlagkraft führen (Petretta 2002).

Bei einem so zentralen und lebenswichtigen Organ wie dem Herzen ist es nicht verwunderlich, dass die Natur auch Lebewesen mit Giften ausgestattet hat, die das Herz ihrer Fressfeinde in seiner Funktion stören um diesem so zu schaden. Vor allem findet man solche kardialen Toxine bei Pflanzen, aber auch bei Tieren, wie Reptilien und Amphibien. Das am häufigsten anzutreffende Wirkprinzip der pflanzlichen Toxine ist die Hemmung der kardialen Natrium-Kalium-ATPase (NKA). Dieses Enzym sorgt im Myozyt unter ATP-Verbrauch für den Austausch von 3 Natriumionen aus dem Myozyten gegen 2 Kaliumionen in den Myozyten. Sie reguliert somit u.a. das Membranpotential und steuert indirekt die K⁺-Konzentration der Zelle (Altamirano 2006). Eine NKA-Hemmung findet man bei den Steroid-abgeleiteten Stoffgruppen, den Cardenoliden (fünf-gliedriger Lactonring) und Bufadienoliden (sechs-gliedriger Lactonring). Die Inhibition der NKA durch diese Stoffe führt zu einer Zunahme der intrazellulären Na⁺-Konzentration und somit zu einer Zunahme der NCX-Aktivität. Dies wiederum führt zu einer Zunahme der intrazellularen Ca²⁺-Konzentration und einem positiv inotropen Effekt. Bei einer toxischen Dosis hat dies hingegen eine Paralyse der Vagus-Nerven im Herzen zur Folge und führt somit zu unkoordinierten Kontraktionen des Herzens und schließlich zum Kreislaufstillstand. Einige dieser Stoffe sind: Convallotoxin (Cardenolidglykosid aus dem Maiglöckchen Convallaria majalis), Digitoxin (Cardenolidglykosid aus dem Fingerhut Digitalis purpurea), Bryotoxin B und C (Bufadienolide aus Kalanchoe delagoensis), Oleandrin (Cardenolid aus dem Oleander Nerium oleander), Proscillaridin (Bufadienolid aus der Weißen Meerzwiebel Drimia maritima), α - und β -Antiarin (Cardenolidglykoside aus dem Upasbaum Antiaris toxicaria) und Cheirotoxin (Cardenolidglykosid aus dem Goldlack Cheiranthus cheiri). Außerdem das besonders in Afrika als Pfeilgift verwendete g-Strophanthin (Cardenolidglykosid aus Strophanthus *spp., Acokanthera spp.* und *Apocynum cannabinum*).

Schon früh verstand der Mensch, dass es "allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift sei" (Paracelsus, 1538). Und so gibt es heutzutage viele dieser eigentlich hochgiftigen Stoffe die in geringer Konzentration als Mittel bei Herzproblemen verwendet werden. Das wohl bekannteste Beispiel dürfte hier Digitoxin aus dem Fingerhut *Digitalis purpurea* sein, das in geringer Dosierung schon früh als Medikament bei Herzerkrankungen, wie chronischer Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern, verwendet wurde. Die Hemmung der NKA wirkt hierbei hilfreich auf das insuffiziente Herz, vor allem durch eine Steigerung der Kontraktilität über die Erhöhung der intrazellulären K⁺-Konzentration.

1.2. Herzinsuffizienz

1.2.1. ALLGEMEINES

Die Herzinsuffizienz (Herzschwäche) ist mit ca. 386.000 Fällen in Deutschland im Jahr 2012 (Statistisches Bundesamt, ICD-10: I50) eine weit verbreitete Erkrankung des Herzens und derzeit der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt. Mit ca. 50.000 Sterbefällen pro Jahr in Deutschland ist sie außerdem beteiligt an rund 6 % der jährlichen Sterbefälle und sorgt mit 3200 Mio. Euro (im Jahr 2008) für erhebliche Kosten für das deutsche Gesundheitssystem (Statistisches Bundesamt). Eine Herzinsuffizienz bezeichnet eine Schwäche des Herzen bzw. seine Unfähigkeit die erforderliche Pumpleistung zu erbringen um das normale Herzminutenvolumen zu garantieren.

Besonders ältere Menschen sind gefährdet an einer Herzinsuffizienz zu erkranken, so gehört die Herzinsuffizienz bei Menschen über 65 Jahren zu einer der häufigsten Erkrankungen die zu einem stationären Krankenhausaufenthalt führten. Außerdem gehört sie bei Menschen über 65 zur vierthäufigsten Todesursache (nach chronisch ischämischen Krankheiten, akutem Myokardinfarkt und Tumore an Bronchien und der Leber) (statistisches Bundesamt, Gesundheit im Alter, 2012).

Die Einteilung der Herzkrankheiten (Herzinsuffizienz) erfolgt nach der NYHA-Klassifikation (New York Heart Association). Je nach Schwere der Erkrankung unterscheidet man zwischen NYHA I (ohne körperliche Beschwerden) bis zu NYHA IV (starke Beschwerden mit Bettlägerigkeit).

1.2.2. SYMPTOMATIK UND URSACHEN

Eine Herzinsuffizienz macht sich bemerkbar durch Ermüdungszustände, Kurzatmigkeit, Keuchen, Appetitlosigkeit, Schwellungen an Füßen, Fußgelenken und Beinen und führt gelegentlich zu einem unnatürlichen oder geringen Herzschlag. Aufgrund des verringerten Herzminutenvolumens kann es außerdem zu einer Verminderung der Muskelmasse kommen. Bei weiter vorangeschrittenen Fällen einer Linksherzinsuffizienz kann sich Flüssigkeit in der Lunge sammeln, was mit Husten pinken Schaums, Erstickungsgefühlen und einer blassen bis fast bläulichen Hautfärbung einhergeht.

Ab einem Alter von 65 nimmt das Risiko an Herzinsuffizienz zu erkranken stark zu. Außerdem wird das Risiko durch Fettleibigkeit stark erhöht, da diese zu einem erhöhten Blutdruck und einer Typ II Diabetes führen können. Die Diabetes selbst stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. Weitere Risikofaktoren sind das Rauchen und Alkohol- bzw. Drogenmissbrauch und die Einnahme hoher Mengen anaboler Steroide.

Eine häufige Ursache für eine Herzinsuffizienz sind die Auswirkungen einer Arteriosklerose, die zu einem Herzinfarkt und zu einem Pumpdeffekt der linken Herzhälfte führen können. Ein Pumpdeffekt der einen EF < 40 % zur Ursache hat (Mensch) stellt eine Indikation zur Behandlung dar (Hoppe 2005). Weiterhin stellen Erkrankungen des Herzmuskels (Kardiomyopathien) eine wichtige Ursache der Herzinsuffizienz dar, wobei der Herzmuskel hypertrophiert (verdickt) oder dilatiert (erweitert). Eine weitere Ursache für eine Herzinsuffizienz ist ein zu hoher Blutdruck, was hier meist von einer Verdickung der Ventrikelwand oder einer Verminderung der Kontraktionsfähigkeit des Herzens hervorgerufen wird. Bluthochdruck führt zu einer anhaltenden Druckbelastung des Herzmuskels, Arteriosklerose zu einer Sauerstoffunterversorgung des Myokards. Dies hat das Absterben von Kardiomyozyten und somit eine Schädigung des Herzens zur Folge. Das insuffiziente Herz ist nicht mehr in der Lage die notwendige Leistung zu erbringen um das notwendige Herzminutenvolumen aufrecht zu erhalten (Vorwärtsversagen). Das Herzminutenvolumen und der Blutdruck sinken. Außerdem kommt es zu einem Rückstau des Blutes in den Lungenkreislauf bzw. die Körperperipherie, was zu einem Lungenödem führt (Rückwärtsversagen). Durch die hierbei erhöhte Vorlast kommt es zur Aktivierung des Frank-Starling-Mechanismus. Unterstützt wird das Ganze meist durch eine erhöhte Na⁺- und Wasserrückresorption, was das extrazelluläre und intravasale Volumen erhöht. Dies alles setzt Mechanismen

der Gegenregulation in Gang, welche zu einem Umbau ("*Remodelling*") des Herzens führen.

1.2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE PROZESSE

Die reduzierte Pumpfunktion des Herzens (verringertes Herzminutenvolumen) aktiviert das sympathische System und führt so zu einer Produktion von positiv ionotrop und chronotrop wirkenden Katecholaminen, wie Noradrenalin (NA) (Brodde 1989). Die Aktivierung der β_1 -Adrenozeptoren im juxtaglomerulären Apparat durch das NA induziert die Ausschüttung von Renin, was die Produktion von Angiotensin II fördert und somit das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert. Außerdem führt die erhöhte Katecholaminund Angiotensin II - Konzentration zur Produktion von Atrialen- und B-Typ Natriuretischen Peptiden (ANP, BNP). Die Aktivierung des RAAS dient als Maßnahme der Gegenregulation infolge des gesunkenen Herzminutenvolumen und des, durch das Vorwärtsversagen auftretenden, Blutdruckabfalls. Es führt zu einer Retinierung von Flüssigkeit, was Blutdruck bzw. die Vor- und Nachlast des Herzens erhöhen soll. Dies funktioniert aber nur beim gesunden Herzen. Im insuffizienten Fall führt es zu besagter Flüssigkeitsstauung in der Lunge und langfristig zu einem Lungenödem.

Um die Herzleistung des insuffizienten Herzens zu kompensieren erhöht das freiwerdende NA über beta-adrenerge Aktivierung Herzfrequenz und Schlagkraft. Hierbei kommt es zu einem Anstieg der myokardialen cAMP-Konzentration. Allerdings führt eine lang anhaltende sympathische Erregung zu dauerhaften molekularen und strukturellen negativen Veränderungen des Herzens. Dies geht einher mit einer Abnahme der Dichte an β_1 -Adrenozeptoren (β_1 -AR), wodurch die inotrope Wirkung des NA am Herzen mit der Zeit reduziert wird (Lohse 2003, El-Armouche 2003). Die Stimulation der entsprechenden Rezeptoren durch Noradrenalin und Ang II führt zu einer pathologischen Hypertrophie der Myozyten durch einen Gaq-abhängigen Signalweg (McMullen 2007, El-Armouche 2003).

Die Hypertrophie kardialer Myozyten ist gekennzeichnet von einer bis zu 70 %igen Vergrößerung des Zellvolumens (Anversa 1985). Man unterscheidet hierbei zwischen exzentrischer Hypertrophie (Ventrikel mit dünner Wand und großem Volumen, Dilatation) bei Volumenbelastung und konzentrischer Hypertrophie (Ventrikel mit dicker Wand und kleinem Volumen) bei Druckbelastung (Bernardo 2010).

Die zunächst für das insuffiziente Herz vorteilhaft gedachten Umbauprozesse werden für das Herz zunehmend, in den späteren Phasen der Insuffizienz, negativer und schädigen die Herzmuskelzellen. Insbesondere durch eine entstehende Ischämie aufgrund der Hypertrophie. Schließlich gehen die geschädigten Herzmuskelzellen durch Nekrose oder Apoptose zugrunde.

Verletzte Kardiomyozyten setzen Zytokine, wie In-Konzentration an TGF-ß erhöht sich schon sehr früh in der geschädigten Zone und stimuliert Makrophagen- und Fibroblasten-Chemotaxis und die Proliferation von Fibroblasten (Desmouliere 1993). Eine Erhöhung des gamma-Interferons setzt die Produktion von Stickstoffmonoxid in Makrophagen in Gang, was die vaskuläre Permeabilität erhöht und die Entzündungsreaktion in der geschädigten Zone eindämmt (Sigusch 1996). Aktivierte Makrophagen exprimieren Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) und stellen eine lokale Ang II - Quelle dar die unabhängig vom Ang II des Plasmas reguliert wird und eine entscheidende Rolle in der Fibroseentstehung spielt. Die frühe Freisetzung von TGF-β aus nekrotischen Myozyten und Makrophagen ist auch wichtig für die phenotypische Transformation von interstitiellen Fibroblasten zu Myofibroblasten (Rosenkranz 2004). Myofibroblasten exprimieren Gene für Prokollagen Typ 1, 3 und 4, stellen Ang I und II her und besitzen Rezeptoren für Ang II und TGF-β (Sutton 2000). Außerdem ist die Differenzierung assoziiert mit einer erhöhten Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten und der Bildung von Aktin-Stressfasern, welche sich durch die Expression von alpha-Glattmuskel-Aktin (a-SMA, von "alpha-smooth muscle actin") auszeichnen (Sutton 2000). Die Synthese des Kollagens Typ I, II und IV durch Myofibroblasten wird moduliert durch verschiedene Faktoren, darunter Fibroblastenwachstumsfaktoren, ANP, Ang II, Bradykinin-gesteuerte Freisetzung von Prostaglandin E und Stickstoffmonoxid.

Aldosteron wird ebenfalls durch Myofibroblasten synthetisiert und nimmt im Herzen eine 17fach höhere Konzentration als im Plasma ein (Sun 1994). Aldosteron, welches durch NO, ANP und Ang II reguliert wird, stimuliert die Transkription von Kollagen Typ I und III mRNA (Sutton 2000). Die Ablagerung von Kollagen Typ I und III erfolgt vornehmlich in den durch Nekrose / Apoptose abgestorbenen Bereichen. Nichtsdestotrotz erfolgt es auch im gesunden Bereich des Myokards sobald die interzellulären Signale durch exzessive Nekrose der Myozyten potenziert werden.

Schließlich verliert der Herzmuskel mehr und mehr gesunde aktive Herzmuskelzellen, welche durch fibrotisches Gewebe ersetzt werden. Die Kraft lässt nach und der Muskel wird durch die entstehende Fibrose steifer, die mechanischen Eigenschaften des Myokards verschlechtern sich nachhaltig. Nachdem sich eine stabile fibrotische Narbe gebildet hat, wird die Kollagen-Produktion reduziert und die meisten Myofibroblasten fallen einer Apoptose zum Opfer.

1.2.4. THERAPIE

Wichtig ist es hier, die Ursache der Herzinsuffizienz und ungünstige Begleiterscheinungen, wie Übergewicht, ein zu hoher Blutdruck, Blutarmut, Nierenschwäche oder eine Schlafapnoe ebenso zu behandeln, wie die Herzinsuffizienz selbst (siehe, "Arzneiverordnung in der Praxis").

Der Vasodilator Hydralazin und Isosorbiddinitrat, welches die Sauerstoffversorgung des Myokards verbessert, waren die ersten zugelassenen Stoffe, wurden dann aber von ACE-Hemmern abgelöst. Zur Therapie der Herzinsuffizienz mit Medikamenten gibt es heutzutage vier große Gruppen, die nachweislich die Sterblichkeit reduzieren, ACE-Hemmer, Aldosteronantagonisten, AT1-Antagonisten und Betablocker.

Bei der Wirkung auf das Herz differenziert man zwischen chronotroper Wirkung (Wirkung auf die Herzfrequenz), dromotroper Wirkung (Wirkung auf die Erregungsleitung am Herzen), inotroper Wirkung (Wirkung auf die Kontraktionskraft), bathmotroper Wirkung (Wirkung auf die Reizschwelle des Herzen) und einer lusitropen Wirkung (Wirkung auf die Relaxation des Herzen). Je nachdem ob eine erhöhende oder erniedrigende Wirkung zu erwarten ist, spricht man von "positiv" oder "negativ". Wird die ACE durch ACE-Hemmer gehemmt kommt es zu einer verminderten Umsetzung von Ang I zu Ang II und zu einem verminderten Bradykinin-Abbau. Die Folge ist eine Senkung des Blutdrucks und somit eine Verminderung der Nachlast. Außerdem beobachtet man eine Hemmung des Remodelings nach einem Herzinfarkt. Klinisch eingesetzte ACE-Hemmer sind z.B. Ramipril, Captopril und Enalapril. Aldosteronantagonisten hemmen die Wirkung des Aldosterons über eine Blockade seines Rezeptors, dies führt zu einer Erhöhung der Na⁺-Ausscheidung (diuretische Wirkung) und einer Erweiterung der Blutgefäße (Blutdrucksenkung). Bei systolischer Herzinsuffizienz konnte eine Risikoreduzierung und höhere Überlebensrate bei Gabe des Aldosteronantagonisten Spironolacton gefunden werden (Pitt 1999).

AT1-Antagonisten hemmen spezifisch den AT1R, dies führt, wie auch bei ACE-Hemmern, zu einer Erniedrigung des Blutdrucks und somit zu einer Verminderung der Nachlast. Sie führen nicht zu einer Hemmung des AT2R. Häufige Verwendung finden hier Sartane, wie Valsartan und Candesartan. Allerdings fehlt den AT1-Antagonisten die Bradykinin-erhöhende Funktion der ACE-Hemmer. Da Ang II bei der Entstehung von Fibrose beteiligt ist, führt eine Hemmung der Ang II-Wirkung durch ACE-Hemmer oder AT1-Antagonisten außerdem zu einer Verminderung des fibrotischen Remodelings.

Betablocker blockieren die β -Adrenozeptoren. Man kennt hier unselektive Betablocker, die β_1 - und β_2 -AR blockieren (z.B. Propranolol) und spezifische, die entweder β_1 - oder β_2 -AR blockieren. Als β_1 -spezifische Betablocker finden Metoprolol und Bisoprolol am meisten Verwendung. Sie führen durch ihre negativ inotrope und chronotrope Wirkung im Wesentlichen zu einer Reduzierung des Blutdrucks und der Herzfrequenz und somit zu einer Verminderung der Herzarbeit des insuffizienten Herzens. Außerdem besitzen sie antiarrhytmische und sympatholytische Wirkung und führen, nach einer Eingewöhnungsphase, zu einer Erhöhung der linksventrikulären Auswurffraktion. Allerdings muss hier mit einer einschleichenden Dosierung das insuffiziente Herz langsam an die Sympathikusreduzierung gewöhnt werden. Gelegentlich wird aufgrund der negativ inotropen Wirkung anfänglich auch eine kurzzeitige Verschlechterung der hämodynamischen Situation beobachtet.

Ein anderer therapeutischer Ansatz bezieht Substanzen mit ein, welche die Pumpleistung des durch Herzinsuffizienz geschwächten Herzens stärken (positiv inotrop), wie Digitoxin oder cAMP-erhöhende Stoffe. Eine Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration erreicht man entweder durch Förderung der Synthese oder durch Verminderung seines Abbaus mit Hilfe von Phosphodiesterase (PDE)-Hemmern.

So wurde der nichtselektive PDE-Hemmer Trapidil schon früh als Koronardilatator zur Behandlung von Ischämie verwendet. Neben der positiv inotropen Wirkung besitzen PDE-Inhibitoren zusätzlich eine vasodilatatorische, positiv chronotrope und positiv lusitrope Wirkung und haben somit eine fördernde Wirkung auf die hämodynamische Situation des insuffizienten Herzens. In kardialen Myozyten findet sich vornehmlich PDE3, aber auch PDE1, 2, 4, 5, und 8 (Mika 2012). Daher waren die ersten für Herzinsuffizienz zugelassenen PDE-Inhibitoren spezifische Inhibitoren der PDE3, wie Cilostazol oder Milrinon. PDE3-Inhibitoren zeigen aber bei längerfristiger Anwendung eine Verschlechterung der Symptome und eine signifikante Erhöhung der Sterblichkeit und sollten daher nur in Kurzzeitanwendungen, von bis zu 2 Wochen, angewendet werden.

1.3. Phosphodiesterasen

1.3.1. ALLGEMEINES

Phosphodiesterasen (PDEs) sind Enzyme welche die Botenstoffe cAMP und cGMP hydrolytisch spalten und zu AMP bzw. GMP umsetzen. Sie zählen zur Enzymklasse der Hydrolasen. Bei der Hydrolyse kommt es zu einer Spaltung der 3'-zyklischen Phosphatbindung. cAMP wurde zuerst von Earl Sutherland und Theodore Rall als Signalstoff identifiziert (Rall 1957), was Sutherland 1971 zu einem Nobelpreis der Medizin verhalf. Die Funktion von cGMP als Signalstoff wurde erst Jahre später entdeckt. Ferid Murad zählt bei der Aufklärung der Signalfunktion des cGMP als eine wichtige Person (Kimura 1974, Murad 1978). Die Botenstoffe cAMP und cGMP werden in der Zelle lokal durch Zyklasen produziert, zum Großteil als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie z.B. Noradrenalin, Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) oder Stickstoffmonoxid (NO). Um die Spezifität bezüglich der Aktivierung nachgeschalteter Zielstrukturen zu gewährleisten, sind Lokalisation, Wirkdauer und Wirkstärke des cAMP/cGMP-Signals streng kontrolliert. Diese raumzeitliche Kontrolle und Stärke der cAMP/cGMP-Konzentration wird durch Phosphodiesterasen (PDEs) erreicht, welche die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide zu ihren inaktiven 5'-Monophosphaten katalysieren. Messungen mit herkömmlichen biochemischen Methoden kommen auf einen basalen cAMP-Spiegel von rund 1 µM in der unstimulierten Kardiomyozyte. In silico-Berechnungen unterstützen dies, gehen aber außerdem je nach Stimulation von einer cAMP-Konzentration von 100 nM – 2 μ M in den Caveolae aus (Iancu 2007).

PDEs werden in verschiedene Isotypen unterteilt, so kennt man in Säugetieren heutzutage PDE1 - 11. Man unterscheidet hier drei Gruppen. PDEs die nur cAMP hydrolysieren (PDE4, 7 und 8), PDEs die nur cGMP hydrolysieren (PDE5, 6 und 9) und PDEs die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren (PDE1, 2, 3, 10 und 11). Viele PDEs (2, 4, 5, 6, 10 und 11) besitzen neben der katalytischen Domäne, welche durch das Motiv H(X)3H (X)25-35(D/E) charakterisiert ist, zusätzlich noch zwei sog. GAF-Domänen, welche verantwortlich sind für eine Dimerisierung oder für cAMP- bzw. cGMP-Bindung. GAF ist ein Akronym für die drei Domänen, in denen man diese Struktur zuerst fand, und steht für "Säuger cGMP-bindende Phosphodiesterasen, Anabaena Adenylatzyklasen und E. coli FhlA Transkriptionsfaktor". Die katalytische Domäne aller PDEs besitzt außerdem zwei konservierte Bindestellen im hinteren Teil des hydrolytischen Zentrums für divalente Metallionen wie Zn²⁺, Mn²⁺ oder Mg²⁺. Die Bindung der Ionen wird für die katalytische Funktion benötigt. Meist sitzt an der ersten Bindestelle ein Zn²⁺, welches über Histidin und Aspartat fest verankert ist, und an der anderen Bindestelle ein eher lockeres Mg²⁺ oder auch Mn²⁺. Die katalytische Domäne der PDEs besteht aus 16 Alpha-Helices, welche aus 3 Unterdomänen bestehen, die eine Tasche bilden in der das Substrat oder der Inhibitor binden kann. Die Bindung des cAMP oder cGMP stellt man sich so vor, dass ein unveränderliches Glutamin in der Bindungstasche den Purinring über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Je nachdem in welcher Orientierung das Glutamin vorliegt bindet entweder cAMP oder cGMP, aber nie beides (Conti 2007). Bei PDEs die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren ist dieses Glutamin frei beweglich, nicht so bei selektiven PDEs (Conti 2007). Andere Bereiche der α-Helices binden über Wasserstoffbrücken die Ribose und das zyklische Phosphat und halten das Substrat so fest in der katalytischen Tasche (Conti 2007). Die zwei Metallionen besitzen sechs koordinierte Bindungen wobei zwei Wassermoleküle gebunden sind. Bei Substratbindung werden zwei dieser Wassermoleküle durch das Phosphat ersetzt und das Phosphat interagiert mit einem nahegelegenen Histidin (Martinez 2002). Die eigentliche Reaktion wird dann durch ein Nukleophil ausgelöst.

Die ersten bekannten PDE-Inhibitoren waren unspezifische Inhibitoren aus der Gruppe der Purinalkaloide. Diese Alkaloide leiten sich vom Xanthin ab und sind Produkte des Sekundärstoffwechsels verschiedener Pflanzen, wie Kaffee (*Coffea spp.*), Tee (*Camellia sinensis*), Kakao (*Theobroma cacao*), Kola (*Cola spp.*) oder Guarana (*Paullinia cupana*). Die häufigsten Purinalkaloide sind Koffein, Theobromin und Theophyllin. Von diesen natürlichen Stoffen leiten sich künstliche Purinbasen wie 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) ab, welches in der Forschung als nichtselektiver PDE-Inhibitor ($IC_{50} =$ 7 - 50 µM, Cayman Chemicals) verwendet wird.

Inhibitoren der PDE5, wie Sildenafil und Tadalafil, erlangten einen großen kommerziellen Erfolg. Sie werden klinisch zur Zeit aber nur bei erektiler Dysfunktion angewendet. PDE5 gehört zu den cGMP-hydrolysierenden PDEs. cGMP führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Blutgefäße. Eine Hemmung der PDE5 im Myokard verstärkt eine adrenerge inotrope Stimulation, moduliert myokardiale Hypertrophie und schützt gegen Reperfusionsschäden nach akutem Myokardinfarkt (Guazzi 2008), wird hier klinisch jedoch nicht angewendet.

Eine Hemmung der PDE3 war die erste spezifische PDE-Inhibition die klinisch bei einer Herzinsuffizienz verwendet wurde. Die PDE3 besitzt außer der katalytischen Domäne eine Transmembrandomäne und Phosphorylierungsstellen. Sie wird durch cGMP-Bindung inhibiert. Man unterscheidet die Isoformen PDE3A und PDE3B, die sich in ihrem Expressionsgrad und ihrer Affinität zu cGMP unterscheiden (Conti 2007). Im menschlichen Herz ist sie die am häufigsten vorkommende PDE und ihre Expression ist bei Herzinsuffizienz erniedrigt (Molina 2012, Yan 2007). Im Ratten- und Mäuseherz ist die PDE3 hingegen nur die zweitaktivste PDE und die PDE4 ist dominierend (Rochais 2006, Richter 2011). In vitro führt eine Inhibition der PDE3A zu einer verstärkten Apoptose und Hypertrophie von Myozyten (Ding 2005a). PDE3 ist an der Regulation der Myozytenkontraktion und Relaxation über L-Type Kalziumkanäle und SERCA2 beteiligt (Yan 2007). PDE3B ist beteiligt an der Kontrolle des L-Type Kalziumstroms durch Interaktion mit der Phosphoinositid-3-Kinase γ (PI3K γ). Wird sie gehemmt kommt es zu einem Anstieg des Kalziumstroms (Yan 2007). Der Versuch die hämodynamische Situation des insuffizienten Herzens durch PDE3-Hemmung zu verbessern erweist sich aber

Einleitung

eher als nachteilig in Bezug auf die Sterblichkeit (Amsallem 2005, Eschenhagen 2008).

1.3.2. PHOSPHODIESTERASE TYP 2 (PDE2)

Da jedoch die Kontrolle der hämodynamischen Situation des insuffizienten Herzens durch Regulation der cAMP-Konzentration nicht falsch erscheint, ist die Beeinflussung anderer PDEs ein lohnendes Forschungsziel. Interessant scheint hier die PDE2. Sie stellt ein Bindeglied cAMP- und cGMP-vermittelter Signalkaskaden dar. PDE2 ist in der Lage sowohl cAMP als auch cGMP zu hydrolysieren, allerdings mit unterschiedlicher Kinetik. Für die kardiale PDE2 des Rindes fand man einen K_m von 36 μM für cAMP und 11 μM für cGMP (Beavo 2006). Zudem kann dieses Enzym durch eine spezialisierte Domäne allosterisch durch cGMP aktiviert werden, im Gegensatz zu PDE3, welche durch cGMP inhibiert wird (vergl. Abb. 4). Die PDE2 kommt als Homodimer mit einer speziesabhängigen Masse des Monomers von 103 - 105 kDa vor. Die höchste Expression an PDE2-RNA in Mäusen (E14.5, NMRI) findet sich in kranialen Ganglien, in Spinalganglien, im Tegmentum, im Riechkolben, im Genitalhöcker, in den vorderen Gliedmaßen und in der Haut (genepaint, ID EH2642). Im Herzen ist die Expressionsstärke in Ventrikel und Atrium identisch, allerdings findet man im Atrium eine auf bestimmte Subregionen beschränkte Expression und im Ventrikel eine Expression die auf Subpopulationen von Zellen beschränkt ist (genepaint, ID EH2642). Sie trägt bei Herzen von Ratten und Mäusen nur gering zur gesamten PDE-Aktivität bei, im menschlichen Herzen hingegen ist die kardiale PDE2 zusammen mit PDE1 die zweitdominierenste bezogen auf die gesamte PDE-Aktivität (Richter 2011, Rochais 2006, Molina 2012). PDE2 besitzt außer der katalytischen Domäne noch zwei GAF-Domänen, welche als GAF-A und GAF-B bezeichnet werden. GAF-A repräsentiert den Dimerisierungslokus und GAF-B die cGMP-Bindestelle (Abb. 5). Bindung von cGMP an die GAF-B-Domäne steigert die Hydrolyse von cAMP um den Faktor 5 - 30 durch eine nicht-kooperative Enzymkinetik und eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne. Na⁺ kann ebenfalls an der GAF-Domäne binden und hemmt dann die Aktivität der PDE2 (Cann 2007). Die Aktivierung der PDE2 ist au-



ABBILDUNG 4 - Gegensätzliche Regulation der PDE2/3 durch cGMP. cGMP-Erhöhung führt bei PDE3 zu mehr verfügbarem cAMP, bei PDE2 zu weniger. *Illustration erstellt von C. Lämmle.*



ABBILDUNG 5 • Proteinmodell des PDE2-Dimers auf Basis der Röntgenkristallstruktur, PDB: 3IBJ (Pandit 2009). Farblich hervorgehoben sind die entscheidenden Regionen der cGMP-Bindung.

ßerdem von der cGMP-Konzentration abhängig. So wird bei Konzentrationen unterhalb 50 nM lediglich die PDE3 gehemmt, wohingegen die PDE2 unbeeinflusst bleibt. Bei cGMP-Konzentrationen zwischen 200 nM bis 500 nM spricht die PDE2 an und zur PDE3-Hemmung kommt zusätzlich noch eine PDE2-Aktivierung hinzu. Über 1 μ M cGMP wird zusätzlich noch die PDE1 gehemmt (Zaccolo 2007). Somit ist es möglich die cAMP-Antwort auf Katecholamine über die Konzentration an cGMP zu regulieren. Diese Regulation ist von entscheidender Bedeutung, da über das cAMP-Signal Proteinphosphorylierungen gesteuert werden, die einen direkten Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyte haben.

Es existieren zahlreiche selektive Inhibitoren der PDE2. Der Erste, den man kannte, war EHNA ((+)-erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin) mit einem IC₅₀ von 0,8 - 5,5 µM (Cayman Chemicals), der allerdings auch die Adenosin-Desaminase (ADA) hemmt. Neuere PDE2-Inhibitoren, die keine Blockierung anderer Enzyme zeigen, sind PDP (9-(6-phenyl-2-oxohex-3-yl)-2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-purin-6-on) der Firma Bayer mit einem IC_{50} von 0,6 nM, Oxindol mit einem IC_{50} von 40 nM, ND-7001 von Evotec mit einem IC_{50} von 50 nM, IC933 der Firma ICOS mit einem IC₅₀ von 4 nM und der von Bayer entwickelte Inhibitor BAY 60-7750 mit einem IC_{50} von 2,0 (Rind) bis 4,7 (Mensch) nM (Beavo 2006, Gomez 2013). Außerdem existiert der Wirkstoff BCA909 von BioCrea mit nicht publizierter Struktur und IC₅₀, welches zur Behandlungen von kognitive Störung erforscht wird (Gomez 2013). Bei Bindung von BAY 60-7750 in der katalytischen Domäne entsteht eine zusätzliche hydrophobe Tasche, durch die das BAY zusätzlich stabilisiert wird und so für die hohe PDE2-Selektivität mitverantwortlich ist (Zhu 2013). Das PDE2-kodierende Gen findet sich bei der Maus auf Chromosom 7 (7 E3; 7) (NCBI Gene ID: 207728), bei Ratten auf Chromosom 1 (1q32) (NCBI Gene ID: 81743) und beim Menschen auf Chromosom 11 (11q13.4) (NCBI Gene ID: 5138). Bei Säugern unterscheidet man zwischen den Spleißvarianten PDE1A1, PDE2A2 und PDE2A3. Bei Trypanosoma brucei kennt man zusätzlich noch PDE2B. Die Spleißvarianten sind bis auf die 17 - 24 N-terminalen Aminosäuren identisch, welches das Lokalisationsmotiv darstellt. Somit findet man PDE2A3 und PDE2A2 vornehmlich an der Membran, wohingegen PDE2A1 zytosolisch vorliegt. Meist findet sich mehr PDE2A3 als PDE2A2. Die membrangebundenen PDE2-Varianten erfahren nach ihrer Expression eine Myristoylierung und binden dann an die Plasmamembran (Beavo 2006, Russwurm 2009). Wie wichtig die PDE2 ist, sieht man auch daran, dass Mäuse mit einem globalen PDE2-Knockout schon in einem frühen embryonalen Stadium sterben (E17), was bei anderen PDEs nicht gefunden wird (Maurice 2014). Interessant wird die kardiale PDE2 in Bezug auf Herzinsuffizienz durch neuere Forschungsergebnisse. So fand Moltzau et al., dass der erhöhte cGMP-Spiegel, durch die erhöhte CNP-Konzentration bei Herzinsuffizienz, weitgehend von der myokardialen PDE2 reguliert wird. Jedoch nicht, wie PDE3, die Lusitropie des Herzens beeinflusst (Moltzau 2014). Es zeigte sich aber keine Beteiligung der kardialen PDE2 auf die PLB- und TnI-Phosphorylierung unter CNP-Einfluss. Dass die myokardiale PDE2 unter Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle spielt zeigen auch Ergebnisse von Mehel et al. So fand man eine doppelt so hohe PDE2-Konzentration in insuffizienten humanen Herzen, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Dies konnte auch bei chronischer betadrenerger Stimulation, wie es bei Herzinsuffizienz durch die erhöhte NA-Konzentration geschieht, gefunden werden. Hier fand man außerdem eine erhöhte cAMP-Hydrolyseaktivität der myokardialen PDE2. Der inotrope Effekt einer akuten beta-adrenergen Stimulation konnte durch eine myokardiale PDE2-Überexpression und eine damit verbundene Reduzierung des L-Typ Ca2+-Stroms beseitigt werden. Zudem sind diese PDE2-überexprimierenden Kardiomyozyten gegen eine NA-ausgelöste Hypertrophie geschützt (Mehel 2013). Außerdem zeigten Mehel et al. und Mika et al. eine Beteiligung der myokardialen PDE2 am Verkürzungsvermögen des Sarkomers (TnI- und cMyBPC-Phosphorylierung) (Mehel 2013, Mika 2013). Diese neusten Forschungsergebnisse und die Möglichkeit über die PDE2 mit Hilfe der cGMP-Konzentration den zellulären cAMP-Spiegel steuern zu können, machen die (kardiale) PDE2 zu einem viel versprechenden Forschungsthema.

1.4. Transversale Aortenkonstriktion (TAC)

Wie schon geschildert kommt es bei chronisch erhöhtem Wandstress zu einer Hypertrophie des Herzens, was schließlich in einer Herzinsuffizienz enden kann. Ein Modell der druckinduzierten Hypertrophie im Tierversuch stellt die Transversale Aortenkonstriktion (TAC) dar. Für eine TAC-OP wird der Querschnitt der Aorta zwischen dem Ursprung der Truncus brachiocephalicus und der Arteria carotis communis sinistra verengt (Abb. 6). Dies führt zu einer größeren Druckbelastung des Herzens, da der Organismus versucht trotz verengter Aorta das nötige Herzminutenvolumen aufrecht zu erhalten. Schon nach wenigen Tagen lässt sich eine Hypertrophie des Herzens beobachten und schließlich eine Herzinsuffizienz, erkenntlich durch die Erniedrigung der Auswurffraktion (EF) und meist auch der fraktionellen Verkürzungsfraktion (FS). Jedes operierte Tier zeigt hierbei einen anderen Druckgradienten (Stenosegradient). Je stärker die Stenose (bzw. je größer das Herzminutenvolumen) ist, desto höher ist der Gradient, der in mmHg ausgedrückt und mittels Doppler-Echokardiographie ermittelt wird.

Es gilt hier: $p_1^* v_1 = p_2^* v_2(1)$

Wobei p_1 und v_1 = max. prästenotische Strömungsgeschwindigkeit bzw. Druck und p_2 und v_2 = max. intrastenotische Strömungsgeschwindigkeit bzw. Druck. Außerdem gilt nach der Formel für den Staudruck:

$$q = \frac{\rho}{2} * \upsilon^2 \quad (2)$$

Wobei ρ die Dichte des Mediums ist, für Blut liegt sie bei 1,06 g/cm³.



ABBILDUNG 6 - Schema des TAC-Modells bei der Maus. Die Aorta wird am Aortenbogen zwischen *Truncus brachiocephalicus* und der *Arteria carotis communis sinistra* verengt. *Illustration erstellt von C. Lämmle.*

Aus (1) und (2) ergibt sich die Gleichung von Bernoulli:

$$p_1 - p_2 = p = \frac{1}{2} * \rho * (v_2^2 - v_1^2)$$
 (3)

Nach Einsetzen der Dichte und mit 1 mmHg = $133,32 \text{ N/m}^2$ ergibt sich:

$$p = 3.97 * (v_2^2 - v_1^2) \approx 4 * (v_2^2 - v_1^2) \quad (4)$$

Da v_1 sehr klein gegenüber v_2 ist, kann es vernachlässigt werden und man erhält die Formel zur Berechnung des Stenosegradienten p (in mmHg) aus den gewonnenen Werten der Doppler-Echokardiographie:

$$p = 4 * v_{\text{max}}^2 \quad (5)$$

Die ermittelten Gradienten können in Schweregrade unterteilt werden. Man unterscheidet dann hierbei zwischen einer unbedeutenden Stenose (< 25 mmHg), einer leichten Stenose (25 - 49 mmHg), einer mittleren Stenose (50 - 80 mmHg) und einer schweren bzw. kritischen Stenose (> 80 mmHg).

1.5. Echokardiographie

Die Echokardiographie stellt eine der wichtigsten nichtinvasiven Untersuchungsmethoden des Herzens dar, bei der Ultraschall zur Bildgebung verwendet wird. Als Ultraschall wird der vom menschlichen Gehör nicht mehr hörbare Frequenzanteil zwischen 20 kHz und 1 GHz bezeichnet. Für eine Ultraschalluntersuchung wird Ultraschall einer bestimmten Frequenz über einen Schallkopf in das zu untersuchende Objekt gestrahlt. Der eingestrahlte Schall wird im Untersuchungsobjekt an Grenzflächen zwischen Zonen mit unterschiedlichen akustischen Impedanzen teilweise reflektiert. Je größer dieser Unterschied desto mehr des Ultraschalls wird reflektiert. Die akustische Impedanz ist abhängig von der Dichte des Materials, so lassen sich Wasser, Luft und unterschiedliche Gewebearten unterscheiden. Es gilt: Akustische Impedanz (W) = Schallgeschwindigkeit im Medium (c) * Dichte des Mediums (ρ). Die Schallwellen werden in Impulsen in das Objekt geschickt und der reflektierte Schall (Echo) des jeweiligen Impulses mit dem Schallkopf wieder aufgefangen, detektiert und in ein elektrisches Signal gewandelt. Kennt man die Schallgeschwindigkeit im jeweiligen Medium, lässt sich aus der Zeit zwischen Schallimpuls und Echo (Δt) der Abstand des Objekts zum Schallkopf (d) ermitteln. Die Schallgeschwindigkeit im menschlichen Gewebe beträgt ca. 1540 m/s, somit gilt hier $d = (1540^* \Delta t)/2$.

Zur Erzeugung des Ultraschalls bzw. zu seiner Detektion werden meist piezoelektrische Elemente verwendet. Diese Elemente bestehen aus einem Kristall, der sich unter elektrischer Spannung verformt und somit unter Wechselspannung zu Schwingungen angeregt wird. Auf der anderen Seite wird der Kristall durch auftreffenden Schall verformt, was zu einer Ladungsverschiebung im Kristall und somit zu einem elektrischen Signal führt. Dieses Signal wird verstärkt und ausgewertet.

Luft zwischen Schallkopf und Haut des Menschen

bzw. des Tieres erzeugt Zonen mit unterschiedlicher akustischer Impedanz, d. h. der Schall würde schon an der Haut reflektiert werden. Um dies zu verhindern verwendet man ein Ultraschallgel, das dieselbe akustische Impedanz wie die Haut besitzt. Bei der Wahl der Frequenz ergibt sich ein gewisses Dilemma. Je höher die Frequenz, desto besser wird zwar die räumliche Auflösung, aber desto geringer wird auch die Eindringtiefe ins Untersuchungsobjekt. Man ist also gezwungen einen Kompromiss zwischen guter Eindringtiefe und noch akzeptablem Auflösungsvermögen zu finden. Beim Menschen arbeitet man, je nach Untersuchungsobjekt, mit Frequenzen zwischen 1 - 40 MHz (Fetus, Leber, Herz ca. 2 MHz, Haut und Gefäße ca. 40 MHz), bei Mäusen benutzt man meist 10 - 40 MHz.

Es muss auf die richtige Schallintensität geachtet werden. Ist diese zu hoch entstehen Kavitationen im Untersuchungsobjekt (Bildung von Gasblasen), die zu hohen Drücken und Temperaturen führen und so das Gewebe schädigen.

In der Echokardiographie unterscheidet man die 1D-Bilddarstellungsverfahren A-, B- und M-Mode. Bei 1D-Verfahren wird nur die Reflexion eines einzelnen Strahls dargestellt. Der A-Mode ist hierbei nur noch von historischem Interesse. Im B-Mode werden die Ultraschallechos als eine Folge von Punkten unterschiedlicher Helligkeit (64 verschiedene Grauwerte) entlang der Untersuchungsachse dargestellt. Der B-Mode wird heutzutage praktisch in der Echokardiographie auch nicht mehr verwendet, aus ihm leiten sich aber der M-Mode und der 2D-Mode ab. Im M-Mode kommt noch die Dimension der Zeit dazu, hier werden die Bildpunkte verschiedener Helligkeit als Funktion der Zeit dargestellt. Der M-Mode wird meist mit dem 2D-Mode kombiniert (2D/M-Mode). Im 2D-Mode erhält man zweidimensionale Schnittbilder, indem das Objekt im M-Modus in verschiedenen Linien abgetastet wird und diese Linien zu einem Bild zusammengefügt werden. Hierfür sind die piezoelektrischen Elemente im Schallkopf in einer Reihe (einem "array") angeordnet. Je nach Art der Anordnung unterscheidet man hier zwischen "linear array" (alle Elemente auf derselben Ebene) und "konvex array" (Elemente

auf einer konvex gebogenen Ebene). Zur Umwandlung, Filterung und Verbesserung der detektierten Echosignale gibt es unzählige verschiedene komplexe Verfahren, daher wird an dieser Stelle hier nicht näher darauf eingegangen.

Durch Auswertung der so gewonnenen Echobilder lassen sich verschiedene kardiale Parameter gewinnen, die zur Beurteilung der Herzfunktion herangezogen werden. Dazu gehört die Herzfrequenz, die von modernen Geräten automatisch berechnet und angezeigt wird. Andere Parameter die durch händische Auswertung der Echobilder gewonnen werden sind:

- Aus der apikalen langen Achse:
- L_s = Herzlänge in der Systole
- $L_d =$ Herzlänge in der Diastole
- Aus der parasternalen kurzen Achse: $AWth_d = Anteriore Wanddicke in der Diastole$ $LVID_d = Enddiastolischer Durchmesser$ $PWth_d = Posteriore Wanddicke in der Diastole$ $Area_d = Endokardiale Fläche in der Diastole$ $AWth_s = Anteriore Wanddicke in der Systole$ $LVID_s = Endsystolischer Durchmesser$ $PWth_s = Posteriore Wanddicke in der Systole$ $Area_s = Endokardiale Fläche in der Systole$ $Epi_s = Epikardiale Fläche in der Systole$

Hiermit ermittelt man anhand folgender Formeln (Collins 2003) die Werte, die zur Beurteilung der Herzfunktion herangezogen werden:

$$Vol_{s} = \frac{5}{6} * Area_{s} * L_{s}$$
$$Vol_{d} = \frac{5}{6} * Area_{d} * L_{d}$$
$$SV = Vol_{d} - Vol_{s}$$

CO = SV * HR

$$EF = \frac{Vol_d - Vol_s}{Vol_d}$$

$$FS = \frac{LVID_d - LVID_s}{LVID_d}$$

$$FAS = \frac{Area_d - Area_s}{Area_d}$$

$$LVW = 1,05 * \frac{5}{6} * ((Epi_s * (L_s + (\frac{AWth_s + PWth_s}{2}))) - (Area_s * L_s))$$

Die Fraktionelle Verkürzungsfraktion (FS, *Fractional shortening*) gibt hierbei an um wie viel Prozent der Durchmesser des linken Ventrikels sich von Diastole zu Systole verkleinert (entlang der kurzen Achse). Ähnlich verhält es sich bei der Fraktionellen Flächenänderungsrate (FAS, *Fractional area shortening*, oft auch als "FAC", *Fractional area change* bezeichnet), allerdings betrachtet man hier die Änderung der Fläche. Beide Werte werden zur Bestimmung der Linksventrikelfunktion herangezogen. Liegen die Werte über dem Normalbereich deutet dies auf eine erhöhte Kontraktilität hin, liegen sie darunter, kann eine Herzinsuffizienz oder dilatative Kardiomyopathie vorliegen.

Die Auswurffraktion (EF, *Ejection fraction*) gibt den prozentualen Anteil des Blutvolumens an, der während der Systole ausgeworfen wird. Ist dieser Wert zu niedrig deutet dies ebenfalls auf eine Herzinsuffizienz oder eine linksventrikulären Dysfunktion hin. Ein erhöhter Wert kann eine Hyperkontraktilität bedeuten.

Das Herzzeitvolumen bzw. Herzminutenvolumen (CO, *Cardiac output*) gibt das Volumen des Blutes an, das vom Herzen pro Minute in den Blutkreislauf abgegeben wird und stellt somit ein weiteres Maß für die Pumpfunktion des Herzens dar. Es berechnet sich aus dem Schlagvolumen (SV, *Stroke volume*) und der Herzfrequenz (HR, *Heart rate*).

Die genannten Werte sind zwar lastabhängig (vergl. *Preolad*, *Afterload*), können aber trotzdem zur Bestimmung der Herzfunktion herangezogen werden. Die linksventrikuläre Masse (LVW, *Left ventricular weight*) wird meist auf das Körpergewicht normiert (LVW/BW) und nimmt bei Hypertrophie zu. Der Faktor 1,05 repräsentiert hier das spezifische Gewicht von Muskel (Collins 2003) und der Faktor 5/6 ist ein Korrekturfaktor zur Anpassung der berechneten Zylinderform an eine eher physiologische Herzform.

1.6. Langendorff-Perfusion

Durch die zuvor genannte Methode der Echokardiographie lassen sich schon gut Einblicke zur Herzfunktion gewinnen. Es handelt sich aber um eine indirekte Untersuchungsmethode, somit lassen sich auch nicht alle physiologischen Einzelheiten damit studieren. Möchte man besser die Funktionsweise des isolierten Herzens verstehen benötigt man eine Methode um das Herz außerhalb des Körpers eine gewisse Zeit funktionsfähig (d. h. kontrahierend) am Leben zu erhalten. Die erste Methode die dies ermöglichte, war die von Carl Ludwig und Elias Cyon 1866 entwickelte, mit der es möglich war, ein Froschherz außerhalb des Körpers über längere Zeit am Leben zu erhalten (Zimmer 1998). 1895 erweiterte Oscar Langendorff diese Methode schließlich auf Säugetierherzen. Er arbeitete dafür mit Herzen von Katzen, Hunden und Kaninchen, die er an einer Apparatur mit ihrem eigenen Blut durchspülte (perfundierte). Dafür befestigte er eine Kanüle an der aszendierenden Aorta, die über einen Schlauch mit dem blutgefüllten Gefäß verbunden war. Das Blut im Vorratsgefäß wurde über ein Wasserbad auf Körpertemperatur erwärmt und der perfundierende Druck über ein Quecksilbermanometer kontrolliert (Zimmer 1998). Die Verkürzung des Herzens wurde mittels einer sog. Marey'schen Schreibkapsel aufgezeichnet. Nun war es möglich Funktionen des Säugerherzens zu studieren die vorher undenkbar waren. So entdeckte man, dass das entnommene und nicht mehr schlagende Säugerherz wieder zu schlagen begann, sobald es von der Apparatur mit Blut perfundiert wurde. In der heutigen Praxis wird das Blut meistens durch einen synthetischen Puffer mit definiertem pH-Wert, Ionenzusammensetzung und Osmolarität ersetzt. Dafür verwendet man eine



ABBILDUNG 7 - Schematischer Aufbau der vereinfachten Langendorff-Apparatur zur Isolation adulter Kardiomyozyten. Der Digestion- bzw. Perfusionspuffer wird auf 37°C erwärmt und durch das präparierte Herz gepumpt. *Illustration erstellt von C. Lämmle*

physiologische Salzlösung, die auf einen optimalen Blut-pH-Wert von 7,4 gepuffert ist. Außerdem verwendet man häufig Verdrängungspumpen um den nötigen Druck und Fließgeschwindigkeit aufrecht zu erhalten (Abb. 7). Das Prinzip ist aber noch dasselbe wie zu Zeiten Langendorffs. Man verwendet die Langendorff-Perfusion heutzutage außerdem um aus dem Herzen adulte Kardiomyozyten zu isolieren, indem man der Perfusionslösung Enzyme zusetzt um die extrazelluläre Matrix zu verdauen. In einer Variante davon verwendet man hierfür ein Gemisch aus Trypsin und kollagenspaltenden Enzymen (Kollagenasen Typ 2 oder Dispase). Das Trypsin ist eine Endopeptidase, die bei der verwendeten Reaktionsdauer extrazelluläre Proteine spaltet. Kollagenase Typ 2 wird aus Clostridium histolyticum gewonnen und spaltet Proteine mit der Sequenz Pro-X-Glyc-Pro, welche in großer Zahl in Kollagen vorkommt. Dispase ist eine Protease die spezifisch Fibronektin, Kollagen IV und geringfügig auch Kollagen I spaltet, also Proteine der ECM und der Basallamina um die Kardiomyozyten.

Während der Isolation muss darauf geachtet werden, dass die Kardiomyozyten so gut wie möglich geschont werden. Aus diesem Grund versucht man das autonome Schlagen der Myozyten zu Inhibieren, indem man die Ca²⁺-Konzentration so gering wie möglich hält und dem Puffer häufig Kontraktionsinhibitoren wie 2,3-Butandionmonoxim (BDM) oder (±)-Blebbistatin zusetzt. Beide Stoffe wirken hierbei hemmend auf die Myozytenkontraktion indem sie durch Blockierung der ATPase das Myosin-II hemmen (Ostap 2002, Kovacs 2004). Um die isolierten Myozyten in Zellkultur unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, benötigt man eine physiologische Ca2+-Konzentration im Medium. Würde man die isolierten Myozyten jedoch sofort nach der Isolation in den Puffer mit hoher Ca2+-Konzentration (meist 1 mM) geben, dann würden sie zugrunde gehen, dies wird auch als "Kalziumparadoxon" bezeichnet (Piper 2000). Daher erhöht man die Ca²⁺-Konzentration langsam Stück für Stück.

Mit den so isolierten Zellen lassen sich Versuche durchführen, sie lassen sich allerdings nur wenige Tage bis maximal 2 Wochen in Kultur halten. Damit die Myozyten auf der gewünschten Unterlage anhaften ist es sinnvoll sie mit Laminin zu beschichten.

1.7. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Als Förster-Resonanzenergietransfer, kurz FRET, bezeichnet man eine strahlungsfreie Energieübertragung von einem energetisch angeregten Farbstoff auf einen Zweiten, sobald beide eine bestimmte Entfernung zueinander (≤ 10 nm) eingenommen haben. In der Natur findet man dieses Phänomen bei allen zur Photosynthese fähigen Organismen im sogenannten "Lichtsammelkomplex" (LHC). Die Energieübertragung bei FRET erfolgt strahlungslos, indem der angeregte Donor (D) über eine Coulomb-Wechselwirkung durch Dipol-Dipol-Interaktion mit dem Akzeptor (A) eine Oszillation in diesem auslöst. Die Oszillation kann dann im Akzeptor wiederum in Strahlung (geringerer Energie) umgewandelt und abgegeben werden. In der biologischen Forschung werden als Donor und Akzeptor meist Fluoreszensfarbstoffe verwendet. Der Abstand beider Farbstoffe bei dem der Energietransfer noch zu 50 % erfolgt wird als Försterradius R_o bezeichnet und beträgt bei YFP-CFP um die 50 Å (Felber 2004). Die Effizienz E des Energietransfers nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes beider Fluorophore r ab, nach (Felber 2004):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

FRET wird in der biologischen Forschung dazu verwendet um in Echtzeit die Interaktion zweier Proteine zu bestimmen, zur Konstruktion von Biosensoren und für moderne PCR-Techniken. Als Fluoreszenfarbstoffe verwendet man hierbei Gelbfluoreszierendes Protein (YFP), Cyanfluoreszierendes Protein (CFP), Grünfluoreszierendes Protein (GFP), mTurquoise, mCherry und viele andere. Es wird dabei jeweils als Donor der Farbstoff mit der kürzeren Wellenlänge angeregt, der dann die Energie an den Akzeptor weitergibt, welcher dann Licht einer längeren Wellenlänge wieder abgibt. Also zum Beispiel: CFP wird mit 463 nm angeregt, ist kein Akzeptor in der Nähe gibt es Licht mit 475 nm wieder ab. Bei genügend kleiner Entfernung zum Akzeptor (YFP) geht die Energie darauf über und YFP gibt Licht mit 527 nm ab. Dargestellt wird in der Regel das Verhältnis von FRET zu Nicht-FRET, sprich, es wird die Fluoreszenzintensität bei 527 nm und bei 475 nm gemessen und durcheinander geteilt (Ratio = 527/475 = YFP/CFP). Ein Biosensor wird daraus, wenn ein Sensorprotein über Linker mit Akzeptor und Donor verbunden wird. Bindet dann das gesuchte Molekül am Sensorprotein kommt es zu einer Konformationsänderung, welche den Abstand zwischen Donor und Akzeptor entweder erhöht (FRET-Löschung) oder erniedrigt (FRET-Auslösung). Es gibt mittlerweile eine ganze Reihe von Sensorproteinen, die verwendet werden. Manche reagieren auf Proteinphosphorylierung, andere auf die Kalziumkonzentration (Calmodulin Bindepeptid M13 als Kalziumsensor), auf die Konzentration cyclischer Nukleotidmonophosphate (z.B. EPAC2 als Sensor zur Detektion von cAMP) und auf vieles weitere (Sato 2002, Miyawaki 1997, Sprenger 2013). Die Funktionsweise des EPAC2-Biosensors ist in Abb. 8 zu erkennen. Nach Ratio = YFP/CFP würde hier allerdings das FRET-Signal mit steigender cAMP-Konzentration sinken. Um einen besser nachvollziehbaren Zusammenhang zu erhalten, kann hier der Ratio aus CFP/YFP errechnet werden, so dass das FRET-Signal simultan zur cAMP-Konzentration steigt oder fällt.

Verwendet man ein CFP/YFP-System gilt es zu beachten, dass sich die Emissionsspektren von YFP



ABBILDUNG 8 • Funktionsweise des EPAC2-Biosensors auf cAMP. Ohne cAMP-Bindung kommt es zu FRET, welcher bei cAMP-Bindung unterdrückt wird. Nach (Börner 2011).

und CFP überlappen. Man spricht hier auch von einem "Durchbluten" des CFP in den YFP-Emissionskanal. Um dies zu korrigieren verwendet man HEK293A-Zellen, welche nur CFP exprimieren, misst wie stark die Emission im YFP-Kanal zu sehen ist und ermittelt daraus einen Korrekturfaktor B mit dessen Hilfe sich das YFP-FRET-Signal nach YFP_{Korr} = YFP-(B*CFP) korrigieren lässt (Börner 2011). Außerdem gilt bei CFP/YFP-Systemen zu beachten, dass YFP mit $\Phi_F = 0,6 - 0,7$ eine höhere Fluoreszenz-Quantenausbeute (Verhältnis ausgestrahlter zu absorbierter Photonen) besitzt, als CFP mit $\Phi_F = 0,4$ (Edel 2006, Olenych 2007).

1.8. SDS-PAGE und Westerblot

Man kennt inzwischen eine ganze Reihe an Proteinen mit unterschiedlichster Funktion. Abgesehen von ihrer Funktion unterscheiden sich Proteine außerdem durch ihre Größe, ihre Ladung, ihre Löslichkeit und anderen Parametern voneinander. Durch diese Unterschiede lassen sich Proteine aus einem Proteingemisch auftrennen. Eine dieser Trennungsmethoden, die zum ersten Mal 1967 von A. L. Shapiro angewendet wurde (Shapiro 1967), nennt sich SDS-PAGE. SDS-PAGE steht hier Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelekfür trophorese (englisch "Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"). Der Name lässt schon auf eine wichtige Chemikalie dieser Methode, der Auftrennungsmatrix und der Auftrennungsmethode schließen. Das Natriumdodecylsulfat (SDS), das zur Probe gegeben wird, heftet sich an die Proteine in der Lösung, zerstört deren Quartärund Tertiärstruktur und versieht alle Proteine mit einer negativen Ladung. Dabei binden an größere Proteine mehr SDS-Moleküle, so dass größere Proteine negativer geladen werden als kleinere. So entstehen SDS-Protein-Komplexe mit stets demselben Ladung-zu-Masse-Verhältnis (= derselben Mobilität). Daher erfolgt die Auftrennung der Proteine in der Siebmatrix nicht nach Struktur oder Ladung, sondern wirklich nur nach ihrer Molekülgröße (angegeben in Dalton). Die Matrix, in der die Proteine aufgetrennt werden stellt ein Polyacrylamidgel dar, welches durch radikalische Polymerisation von Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid mit Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalquelle und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator hergestellt wird. Die Auftrennung erfolgt dann im elektrischen Feld (Elektrophorese), wobei alle Proteine durch ihre negative Ladung zum positiven Pol (Anode) wandern.

Zur Vorbereitung auf die SDS-PAGE werden die Proteine (heutzutage) mit einem Probenpuffer aufgekocht der 1970 von U. K. Lämmli entwickelt wurde (Laemmli 1970). Dieser Puffer enthält Tris-Puffer (puffert auf pH 6,8), SDS (Grund siehe oben), Glycerol (erhöht die Dichte), Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (spalten Disulfidbrücken) und Bromphenolblau als Farbstoff. Durch das Mercaptoethanol (ME) oder Dithiothreitol (DTT) werden enthaltene Disulfidbrücken zerstört, die Bildung neuer Brücken gehemmt und somit ebenfalls die Proteine angeglichen.

Zur SDS-PAGE verwendet man ein Polyacrylamidgel, das aus zwei Phasen besteht. Einer oberen (Sammelgel) mit niederem Polymerisationsgrad und einem pH von 6,8, in das die Proteine aufgetragen werden. Und einer unteren Phase (Trenngel) mit einem Gel mit, je nach aufzutrennender Proteingröße, unterschiedlich gewähltem Polymerisationsgrad und pH 8,8, in dem die Proteine aufgetrennt werden. Als Elektrophorese-Puffer wird ein Puffer mit einem hohen Gehalt an Glycin verwendet. Im Sammelgel liegt das Glycin nahe seinem isoelektrischen Punkt von pH 6 nahezu ungeladen vor und hat daher eine sehr geringe elektrophoretische Mobilität, im Gegensatz zu allen Anionen im Gel, wie Chlorid. Die Mobilität der geladenen Proteine liegt ungefähr zwischen der des ungeladenen Glycins und der der Anionen. Somit befinden sich die Proteine in einem Feldstärkegradient, dadurch erfolgt eine Aufkonzentrierung der Proteine. Am Übergang zum Trenngel erhöht sich der Reibungswiderstand und es kommt zu einer weiteren Aufkonzentrierung der Proteine an der Übergangsphase. Das Glycin bekommt im Trenngel bei pH 8,8 eine Ladung und überholt die Proteine. Im Trenngel

erfolgt eine Endkonzentrierung der Proteine und es wirkt auf alle Proteine die gleiche Feldstärke, so dass die Auftrennung nur nach der Größe des Proteins erfolgt.

Die aufgetrennten Proteine lassen sich im Gel entweder färben (Coomasie, Silber...) oder zur weiteren Identifikation auf eine Membran übertragen. Hierfür verwendet man meist die um 1979 entwickelte und als "Western Blot" bezeichnete Methode (Renart 1979, Towbin 1979, Burnette 1981). Hierzu werden die im Gel befindlichen Proteine mit Hilfe einer elektrischen Spannung auf eine Membran mit hoher Proteinbindekapazität übertragen (geblottet). Als Membran kommen verschiedene Materialien zum Einsatz, man kennt Membrane aus Nitrozellulose, Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nylon. Das Blotten erfolgt ebenfalls in gepuffertem System mit konstantem elektrischem Strom. Zur Detektion der Proteine verwendet man meist immunologische Methoden mit spezifischen Antikörpern. Hierfür müssen zuerst alle unspezifischen Bindestellen an der Membran mit einem Gemisch verschiedener Proteine geblockt werden. Dazu verwendet man Lösungen von Milchpulver, Gelatine, Albuminen, Casein oder sonstigen Gemischen. Danach inkubiert man die Membran mit einem Antikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bzw. an das Protein in einem gesuchten Zustand (phosphoryliert, methyliert...) bindet.

Je nachdem in welchem Organismus (Maus, Ziege, Kaninchen...) dieser Antikörper produziert wurde unterscheidet sich dessen Fc-Region. Dies nutzt man aus, um an diese Region spezifisch einen zweiten Antikörper zu binden, der mit einem Reportermolekül gekoppelt ist. Man bezeichnet den ersten Antikörper daher auch als primären Antikörper und den zweiten, mit dem Reportermolekül, als sekundären Antikörper. Als Reportermolekül verwendet man meist Enzyme wie Peroxidasen oder alkalische Phosphatasen. Diese Enzyme katalysieren dann Farb- oder Lumineszenzreaktionen (Luminol) um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Bei der Belichtung eins lichtempfindlichen Films hat man es mit einem nicht-linearen, logarithmischen Verhältnis zwischen Proteinkonzentration und Signalintensität zu tun. Entsprechende CCD-Kameras sind für ein lineares Verhältnis ausgelegt.

1.9. Adenoviren

Um gewünschte Proteine in einer Zelle zur Expression oder gar Überexpression anzuregen benutzt man einen Gentransfer über Liposomen oder Viren (Adenoviren, Lentiviren, Retroviren, Herpes-Viren usw.). Adenoviren bieten den Vorteil, dass auch sich nicht im Zellzyklus befindliche Zellen transfiziert werden. Sie bestehen aus einer doppelsträngigen linearen DNA (dsDNA) mit einem terminalen Protein (das sog. "Terminale Protein") kovalent am 5'-Ende. Sie ist von einer Proteinhülle umgeben, welche ein ikosaedrisches Kapsid bildet. An die DNA sind basische Histon-artige Proteine angelagert und sie besitzt an beiden Enden ITRs ("inverted terminal repeats") (Luo 2007). In der Proteinhülle befinden sich Fiberproteine, die über Pentonbasisproteine mit der Proteinhülle verbunden sind. Die DNA des Adenoviruses besteht aus bestimmten Bereichen, die man kurz mit E1, E2, E3 und E4 (frühe Gene) bzw. L1 - L5 (späte Gene) bezeichnet (He 1998, Luo 2007). Der Bereich E1 ist für die Replikation des Virus wichtig, E2 für die DNA-Replikation und die Transkription der späteren Gene, E3 für die Modulation der Immunantwort der infizierten Zelle und E4 für den Metabolismus der Virus-mRNA zur Förderung der Virus-DNA-Replikation (He 1998). Die späten Genprodukte werden zum Aufbau des Virion benötigt. In transgenen Adenoviren für den Laborgebrauch sind die Bereiche E1 und E3 aus Sicherheitsgründen deletiert und durch das zu exprimierende Gen ("Gene of interest", GOI) ersetzt (Luo 2007). Diese Viren sind also nicht in der Lage sich selbst zu vermehren. Zur Vermehrung von künstlichen Adenoviren (bei Ihrer Herstellung) verwendet man daher HEK293-Zellen. Diese Zellen enthalten Teile der DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5. Sie besitzen daher die adenovirale E1A-Region, komplementieren das Adenovirus und führen damit zu seiner Replikation. Alternativ können auch HEK911- oder PER.C6[®]-Zellen verwendet werden (Kovesdi 2010).

Das Virus dockt mit Hilfe der Fiber- und Pentonproteine an Rezeptoren an der Zelloberfläche der Wirtszelle (Kardiomyozyt, Fibroblast...) an. Diese sog. Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptoren (CAR-Proteine) werden von vielen Zellen im Körper exprimiert. Nach dem Andocken interagieren die Pentonproteine mit av β 3- und av β 5-Integrinen auf der Zelloberfläche, wodurch das Virus durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Luo 2007). In der Zelle wird das Virus aus dem Endosom freigesetzt und gelangt über Bindung an Mikrotubuli zu den Kernporen wo die virale DNA mit dem GOI in den Zellkern entlassen wird und die Transkription des GOI beginnt.

1.10. Transgene Mausmodelle

Die moderne Wissenschaft kennt einige sogenannte Modellorganismen. Es handelt sich hierbei um genetisch möglichst einheitliche Organismen, die einfach zu züchten und zu untersuchen sind. Man unterscheidet hierbei zwischen Bakterien, Pilzen, Pflanzen, wirbellosen Tieren und Wirbeltieren. Unter den Wirbeltieren grenzt man noch zwischen Fischen, Vögeln, Amphibien und Säugetieren ab. Wobei die Säugetiere dem Menschen am nächsten sind. Die am meisten genutzten Säugetier-Modellorganismen sind Mäuse (Mus musculus) und Ratten (Rattus norvegicus). Transgene Techniken gibt es zwar auch bei Ratten, Kaninchen, Rindern, Schweinen und Primaten, sie sind aber vornehmlich bei Mäusen etabliert. Da man sich vergleichbare und statistisch möglichst einfach auswertbare Ergebnisse wünscht, findet man bei Labormäusen verschiedene standardisierte Stämme. Man unterscheidet hier zwischen Inzucht-Stämmen (einheitlicher genetischer Hintergrund) und Auszucht-Stämmen (variabler genetischer Hintergrund). Wobei Auszuchtstämme nur bei speziellen Fragestellungen verwendet werden. Die wichtigsten im Laboraltag zu nennenden Mäuse-Inzuchtstämme sind C57BL/6, FVB/N, BALB/c, DBA, NMRI-Nacktmaus, 129, C3H und CBA. Für genetische Studien werden häufig die Linien C57BL/6 oder FVB/N verwendet. C57BL/6 sind Mäuse schwarzer Fellfarbe, die 1921 aus einem Bruder-Schwester-Paar gezogen wurden und in höherem Alter zu Haarausfall und Taubheit neigen, sowie eine erniedrigte Insulin-Sekretion zeigen (Jackson Laboratory). FVB/N ist ein Albinostamm, der 1966 entstand und aufgrund der durch eine Homozygotie des Pde6brd1Allels ausgelösten Netzhautdegeneration von Nachtblindheit betroffen ist (Janvier Labs).

Seit der Publikation des Meilenstein-Papers 1982 von Palmiter *et al.* (Palmiter 1982) hat sich die Technologie zur Generierung konventioneller transgener Organismen durch Mikroinjektion in fertile Oocyten kaum geändert. Hinzugekommen sind Techniken mit embryonalen Stammzellen.

Aus genetischer Sicht repräsentieren alle ursprünglichen transgenen Mäuse einem Modell, bei dem das gewünschte Gen in seiner Aktivität gesteigert ist. Allerdings sind menschliche Erkrankungen oft durch den Verlust einer Genfunktion oder durch homozygote rezessive Mutationen charakterisiert. Dies konnte erst in den späten 1980er Jahren durch RNAi-basierte Methoden realisiert werden. Dennoch war es lange Zeit schwer Gene komplett stillzulegen. Daher war die Entwicklung der "Loss-of-function"-Mutation so bedeutend, dass für ihre Entwicklung Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies 2007 dafür den Nobelpreis für Medizin bekamen (Thomas 1987, Smithies 1985). 1988 wurde schließlich eine Methode publiziert in der ein beliebiges Gen in embryonalen Stammzellen von Mäusen gezielt abgestellt werden konnte. Hierzu wird zuerst ein Genkonstrukt angefertigt, das mit dem zu deaktivierenden Gen identisch ist, jedoch eine Mutation trägt. Mit diesem wird mithilfe von Gene-Targeting das gewünschte endogene Gen in der Knockout-Maus deletiert. Hierbei macht man sich die homologe Rekombination zu Nutze. Das Genkonstrukt beinhaltet meist auch ein Reportergen und einen Selektionsmarker. Dieses Konstrukt wird in Bakterien herangezogen und anschließend durch Mikroinjektion oder Elektroporation in embryonale Stammzellen übertragen. Die positiven Zellen werden selektiert und in einen Embryo injiziert, welcher in eine Leihmutter verbracht wird. Hieraus entstehen chimäre Tiere aus zwei Zelltypen. Diese werden mit Wildtyp-Tieren gekreuzt um schließlich reine *Knockout*-Tiere zu generieren. Mit dieser Methode lässt sich seitdem praktisch jedes beliebige Gen in Mausmodellen abstellen.

Jedes Transgen benötigt eine regulatorische Sequenz, dies können autologe Gene, gewebsspezifische oder konstitutiv induzierbare Elemente sein. Zur globalen Expression verwendet man meist Promotoren aus den Sequenzen von Histonen, β-Aktin oder aus "houskeeping"-Genen, wie der Phosphoglyceratkinase. Induzierbare Modelle, bei denen die Genexpression beliebig an- und abgestellt werden kann, exprimieren das Gen unter der Kontrolle induzierbaren Aktivatoren. Am häufigsten verwendet man hier durch Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin induzierbare Systeme (tTA = tet-OFF, rtTA = tet-ON) und das durch Tamoxifen induzierbare Cre/ loxP-Rekombinase System (Jaisser 2000). Mittlerweile existiert auch eine verbesserte Variante des Cre-Rekombinase-Systems welches als "MerCre-Mer" bezeichnet wird (Jaisser 2000). Je nachdem welche regulatorische Sequenz verwendet wird, folgt das Expressionsmuster dem endogenen Vorbild oder ist auf bestimmte Zelltypen oder bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt. So wird der Promotor der α-Isoform der schweren Myosinkette (αMHC) verwendet, um eine Genexpression nur in Kardiomyozyten, also Herz-spezifisch, zu garantieren (Jaisser 2000). Außerdem ist es möglich, Gene in Zelltypen zu exprimieren, in denen das Gen normalerweise inaktiv ist (ektopische Genexpression). In beiden Fällen steht anschließend die Analyse des dadurch veränderten Phänotyp des Tiers.

Transgene Tiere werden typischerweise durch Retrovirale Transduktion des frühen Embryos, Einführung des Transgens in embryonale Stammzellen oder, wenn die Überexpression eines Proteins gewünscht ist, durch Mikroinjektion der DNA direkt in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle einer Maus erzeugt. Die DNA braucht dafür nicht homolog mit dem Genom des Wirtstieres zu sein. Mikroinjizierte DNA integriert zufallsbedingt auf einer Seite des Genoms, oft als Concatemer (sich in linearer Abfolge wiederholende DNA-Einheiten) in einer "*head-to-tail*"-Manier (5'-Ende des Einen mit 3'-Ende des Nächsten).

Die Wahl des genetischen Hintergrundes hängt vom Ziel des Experimentes ab. Oft ist die Wahl aber auch historisch bedingt (z.B. Stamm wurde für diese Art Studien schon immer verwendet) oder weil der Stamm unter einer bestimmten Erkrankung leidet. Der Stamm C57BL/6 wird zum Beispiel oft in der Herzkreislaufforschung verwendet, da diese Linie sehr anfällig auf ernährungsbedingte Arteriosklerose ist.

Ein Nachteil von Inzuchtstämmen ist die geringe Ausbeute an Ein-Zell-Zygoten bei Superovulation (s. u.). Außerdem haben Zygoten von Inzuchtstämmen oft eine geringere Lebensfähigkeit bei Mikroinjektion oder nach Transplantation. Eine Ausnahme stellt hier FVB/N dar, welche nach Superovulation eine gute Anzahl an befruchteten Eiern hervorbringt, weswegen dies oft der Stamm der Wahl bei einer Mikroinjektion ist.

Für eine Mikroinjektion werden Spenderweibchen, die durch Gabe von Gonadotropinen zu einer Superovulation angeregt wurden, mit fertilen Männchen (sog. "Böcken") verpaart. Sodann werden die einzelligen Zygoten aus dem Weibchen isoliert und eine aufgereinigte Lösung mit dem linearisierten Genkonstrukt in den männlichen Pronukleus injiziert. Nach erfolgter Zellteilung werden die entstehenden Embryonen in die Gebärmutter eines durch Hormonbehandlung scheinträchtigen Weibchens implantiert. Die lebensfähigen Nachkommen werden dann relativ früh mit Hilfe einer Genotypisierung (PCR mit genspezifischen Primern) auf das Vorhandensein oder den KnockOut des gewünschten Gens hin untersucht. Die positiv getesteten Tiere (Founder) werden dann direkt für Studien verwendet oder über mehrere Generationen hinweg auf einen anderen bestimmten genetischen Hintergrund gekreuzt (z.B. BL6). Oft ist der genetische Hintergrund aber erst nach 8 - 10 Rückkreuzungen stabil genug.
1.11. 3D-Gewebskulturen

Seit man Mitte der 50er Jahre 2D-Zellkulturen von Kardiomyozyten etablierte, wurde diese Technik zum Standard bei der Erforschung der Funktion von Ionenkanälen, der Regulation kardialer Gene und dem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Hypertrophie. Der größte Nachteil zweidimensionaler Kulturen kardialer Zellen ist jedoch, dass sich damit nicht die wichtigste Funktion des Herzens studieren lässt, die isometrische Kontraktion. Daher wurden Anstrengungen unternommen kardiale dreidimensionale Strukturen zu generieren, die sich besser für Kraftmessungen eignen. Die erste Beschreibung eines Verfahrens zur Generierung einer 3D-Kultur aus kardialen Zellen des Hühnchens wurde von Eschenhagen et al. 1997 beschrieben und als CMPM ("cardiac myocyte-populated matrices") bezeichnet. Die Erzeugung dreidimensionalen Herzgewebes aus Mäuseherzen gelang Eschenhagen et al. schließlich 1999 und wurde hier als EHT ("engineered heart tissue") bezeichnet (Eschenhagen 1997). Seitdem ist die Methode vom Grundprinzip gleich geblieben, hat sich aber in Feinheiten verbessert und die dreidimensionale Struktur wird als EHM ("engineered heart muscle" = Konstruierter Herzmuskel) bezeichnet.

Das Prinzip dahinter ist im Grunde recht einfach. Man mischt dazu eine Zellsuspension an Kardiomyozyten und Fibroblasten mit Kollagen I und Nährsubstanzen und gießt daraus Ringe. Das Kollagen liegt dabei in essigsaurer Lösung vor und wird daher für den Prozess vor der Zellzugabe mit Lauge neutralisiert. Durch die Wärme der nachfolgenden Inkubation und die Neutralisation bildet das Kollagen I Fibrillen und der Ring erhärtet (Hayashi 1973). Nach einiger Zeit fängt der Ring an sich zusammen zu ziehen, er "kondensiert" und bildet so einen kompakten Gewebering. Dies hängt entscheidend mit dem Anteil an Fibroblasten zusammen (Grinnell 2003), auch erkenntlich daran, dass ein EHM ohne Fibroblasten nicht kondensiert.

Mit Hilfe derselben Technik erhält man auch künstliches Bindegewebe (ECT = *"engineered connectiv* *tissue*"), wenn als Zellmaterial reine Fibroblasten verwendet werden.

Dreidimensionale Zellstrukturen haben mehrere Vorteile. Zum einen sind EHMs echtem Herzgewebe und ECTs Bindegewebe deutlich ähnlicher als vergleichbare zweidimensionale Zellkulturen. Außerdem bieten sie die Möglichkeit standardisierte Messungen durchzuführen und die einfachere genetische Manipulierbarkeit im Vergleich zum intakten Herzen.

In EHMs liegen die Kardiomyozyten, wie im echten Herzen, als elektrisch gekoppeltes Syncytium vor, nur, dass die Vernetzung der Zellen nicht ganz so stark ist (Eschenhagen 2002). Die Kardiomyozyten zeigen Anzeichen von Differenzierung, wie hochorganisierte Sarkomere und einem Verhältnis an Myofilamenten, Mitochondrien, Zellkernen, Sarkoplasmatischem Retikulum und Zytosol ähnlich wie in adulten Kardiomyozyten (Eschenhagen 2002). Außerdem findet man T-Tubuli, Desmosomen und weitere Strukturen wie in adulten Kardiomyozyten (Eschenhagen 2002). Das gesamte EHM stellt ein Organoid dar, man findet eine Endokardium-artige äußere Zellschicht, primitive Kapillaren, außerdem sind Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen gleichmäßig im EHM verteilt (Eschenhagen 2002).

EHM und ECT stellen somit eine Möglichkeit dar dem lebenden Vorbild sehr ähnliches kardiales Gewebe zu studieren. Auf lange Sicht wird das Gießen des künstlichen Gewebes in Formen aber sicher abgelöst werden durch die Möglichkeit unterschiedliche Gewebe aus verschiedenen Zelltypen und einer extrazellulären Matrix in genau definierter und reproduzierbarer Weise mit einem Biodrucker direkt zu drucken (Kolesky 2014).

1.12. Zielsetzung der Arbeit

Wenn das Herz, als zentrales Organ des Blutkreislaufs, erkrankt, kann das schwere Folgen für den Betroffenen haben. Eine der häufigsten Erkrankungen des Herzens beim Menschen ist die Herzinsuffizienz. In Vorarbeiten unter Beteiligung dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass im Falle der Herzinsuffizienz die myokardiale Phosphodiesterase des Isotyps 2 (PDE2) hochreguliert wird (Mehel 2013). Myokardiale Phosphodiesterasen stellen eine wichtige Regulationsmöglichkeit dar um die myokardiale cAMP-Konzentration zu reduzieren. Die pathologische Rolle der myokardialen PDE2 ist noch weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit sollte daher die Rolle der kardialen PDE2 bei der Entstehung der Herzinsuffizienz genauer beschrieben werden, um zu ermitteln, ob sich die myokardiale PDE2 als neues therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Herzmuskelschwäche eignen könnte. Hierfür wurde die Funktion der PDE2 im kardialen Fibroblasten, im adulten Kardiomyozyten, in kardialen 3D-Zellkulturmodellen und im transgenen Mausmodell einer myokardialen PDE2-Überexpression untersucht.

II. MATERIAL & METHODEN

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 unter den damit verbundenen Verhaltensregeln. SDS-PAGE und Westernblot in einem Labor der Sicherheitsstufe 1. Die Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) in gleichgeschlechtlicher Haltung (≤ 5 Tiere) in einer pathogenfreien (SPF) Versuchstierhaltung mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus (12 h / 12 h) aufgezogen. Pelletiertes Futter und Leitungswasser stand jederzeit durch die Tierpfleger zur Verfügung. Alle Tierversuchsarbeiten wurden unter Aktenzeichen 33.9-42502-04-10/0065 genehmigt. Die Tierversuche, Organentnahmen und die Haltung der Tiere erfolgte stets im Einklang mit dem derzeit gültigen TierSchG.

2.1. Zellpräparation

2.1.1. PRÄPARATION NEONATALER RATTENZELLEN Zur Gewinnung neonataler kardialer Rattenfibroblasten (NRCF) und Kardiomyozyten (NRCM) wur-

den Wistar-Kyoto-Ratten (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, USA) im Alter von 0 - 3 Tagen dekapitiert und die präparierten Herzen in steriler Kalzium- und Bikarbonat-freier HEPES-gepufferter Hanks balancierter Salzlösung (CBFHH) (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,3 mM Na₂HPO₄, 1 g/l Glukose, 20 mM HEPES, pH 7,4, sterilfiltriert) gesammelt (20 - 80). Sodann wurde das ventrikuläre Gewebe separiert, der Länge nach halbiert und in 20 ml CBFHH-Medium überführt und einmal mit je 20 ml desselben Mediums gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Herzen mit einer Schere für (max.) 9 Minuten gut zerkleinert bis die Gewebestücke eine maximale Größe von ca. 1 mm³ angenommen hatten und weitere 1,5 - 2 ml CBFHH-Medium hinzugegeben. Die so homogenisierte Gewebesuspension wurde in ein 50 ml Falkon-Reaktionsgefäß überführt und durch einminütige Sedimentation grobe und feine Partikel getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibende Gewebesuspension 1 - 2 mal mit je 20 ml CBFHH-Medium gewaschen. Für den Vorverdau des Sedimentes wurde zum Sediment 8 ml einer Trypsin-Arbeitslösung (2,6 mg/ ml Trypsin, 0,004 mg/ml DNAse, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, in CBFHH-Puffer) gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter permanenter Bewegung digeriert. Nach kurzer Sedimentation wurde der Überstand abgenommen und erneut 8 ml Trypsin-Arbeitslösung zugegeben und für 10 min bei RT verdaut. Der Überstand wurde in ein Falkon-Reaktionsgefäß überführt und 7 ml DNAse-Arbeitslösung (0,004 mg/ml DNAse, 3,4 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, in CBFHH-Puffer) zugegeben und 25 mal trituriert. Die Überstände wurden in einem Falkon-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Schritte Trypsin-Verdau, Sammeln des Überstandes, DNAse-Zugabe, Sammeln des Überstandes wurden mehrmals wiederholt, wobei nach jedem Schritt das Volumen an Trypsin- und DNAse-Arbeitslösung um 0,5 ml und die Trypsin-Inkubation um 1 min reduziert wurde. Nachdem das Zellpellet nahezu verschwunden war, wurden alle gesammelten Überstände für 15 Minuten bei 60 g und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, Deutschland) und der Überstand verworfen. Sodann wurde jedes Pellet mit je 2 ml Nicht-Kardiomyozytenmedium (NKM) (DMEM, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) versetzt, die Pellets vereinigt und zu je 30 ml 250 µl DNAse-Lösung (1 mg/ ml) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten, 60 g, 4 °C) wurde das Pellet in 20 - 30 ml NKM resuspendiert, durch ein 250 µm-Zellsieb gegeben und anschließend die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die anschließende Vorkultur (Preplating) wurden 8 ml der gewonnenen Zellsuspension mit 5 ml NKM vermischt und für 60 Minuten auf 15 cm Kulturschalen bei 37 °C / 5 % CO, inkubiert. Während dieser Zeit adhäriert die größte Zahl der Kardiofibroblasten, die Kardiomyozyten jedoch nicht. Sodann konnten die Kardiomyozyten (NRCM) von der Kulturschale gespült und gesammelt werden, die anhaftenden Kardiofibroblasten (NRCF) wurden in NRCF-Medium (DMEM 4,5 g/l Glukose, 10 % FBS, 1 % MEN NEAA, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

2.1.2. GEWINNUNG ADULTER KARDIOMYOZYTEN

Die Gewinnung adulter Maus-Kardiomyozyten (AMCM) erfolgte durch Langendorff-Perfusion mit Kollagen-abbauenden Enzymen. Dazu wurde eine Maus mit Isofluran narkotisiert, durch zervikale Dislokation getötet, der Brustkorb geöffnet und das Herz entnommen. Das Herz wurde in eiskaltes DPBS mit 30 mM BDM gelegt und die Aorta über eine fixierte, auf 10 mm gekürzte und abgestumpfte 20 G - Kanüle (BD Microlance[™] 3, REF301300, Becton Dickinson, USA) gezogen und mit zwei Doppelknoten (Non-Sterile Silk Suture Thread 6/0, 18020-60, FST) fixiert. Sodann wurde die Kanüle in die Langendorff-Apparatur (Abb. 6) eingebaut und das Herz für 3 Minuten mit Perfusionspuffer (113 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,6 mM KH, PO, 0,6 mM Na, HPO₄, 1,2 mM MgSO₄, 0,0425 mM Phenolrot, 12 mM NaHCO₃, 10 mM KHCO₃, 10 mM HEPES, 30 mM Taurin, 5,5 mM Glucose, 10 mM BDM, pH 7,4) bei einer Flussrate von 3,5 ml/min gespült. Anschließend wurde der Perfusionspuffer gegen Verdaupuffer (Perfusionspuffer mit 12,5 µM Ca²⁺, 0,06 mg/ml Liberase DH und 1 % Trypsin) getauscht und dieser komplett (8 Minuten) durch das Herz geleitet. Das nun gelatinöse Herz wurde anschließend in 2,5 ml des Verdaupuffers mit einer Schere für exakt 30 sec. fein zerschnitten, mit 2,5 ml Stopppuffer 1 (Perfusionspuffer, 1 % BSA, 50 µM Ca²⁺) versetzt und für 3 Minuten mit einer Spritze (Omnifix U-40, Braun) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension durch Polyamid-Siebgewebe 150 µm (9.068 291, Th.Geyer, Renningen) filtriert und die Kardiomyozyten für 10 Minuten bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 5 ml Stopppuffer 2 (Perfusionspuffer, 0,5 % BSA, 38 µM Ca²⁺) resuspendiert und in 4-minütigen Schritten langsam die Kalziumkonzentration erhöht (62 µM, 112 µM, 212 µM, 500 μM, 1000 μM). Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37 °C sedimentiert, der Überstand bis auf eine geringe Menge Medium abgenommen, das Pellet im noch vorhandenen Volumen Medium resuspendiert und je 50 - 80 µl Zellsuspension auf mit 20 µg/cm² Laminin beschichtete runde 24 mm Glasplättchen (631-0161, VWR, Radnor, USA) verteilt. Diese Glasplättchen wurden in 6-Wells bei 37 °C / 5 % CO₂ für 1 h inkubiert um die Kardiomyozyten zu adherieren. Sodann wurden die Zellen für FRET-Messungen (2.5.1.) verwendet.

2.2. 2D-Zellkultur

2.2.1. SPLITTEN UND KULTIVIERUNG DER KARDIOFIBROBLASTEN Zur weiteren Verwendung der NRCF wurden diese auf der Vorkulturplatte, bis zu 90 %iger Konfluenz, bei 37 °C kultiviert. Sodann wurde das Medium abgenommen und einmal mit auf 37 °C vorgewärmter Dulbecco's phosphatgepufferter Saline (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen mit 8 ml 0,25 % Trypsin bei 37 °C für 3 Minuten trypsiniert. Die zum Großteil abgelösten Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen weiter abgelöst, mit 16 ml NRCF-Medium (DMEM 4,5 g/l Glukose, 10 % FBS, 1 % MEN NEAA, 100 U/ ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) versetzt um die Wirkung des Trypsins abzumildern und die Zellsuspension in einem Falkon-Reaktionsgefäß gesammelt. Nach dreiminütiger Zentrifugation (1000 rpm, 4 °C, Eppendorf Centrifuge 5804 R) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in frischem NRCF-Medium resuspendiert. Und auf 6-Well-Platten (Sarstedt, 83.1839, Nümbrecht) oder 10 cm-Schalen (BD Falcon, REF353003) verteilt. Danach wurden die Zellen bei 37 °C / 5 % CO₂ kultiviert und entsprechend für die Versuche verwendet.

2.2.2. KRYOKONSERVIERUNG DER KARDIOFIBROBLASTEN Zur Kryokonservierung wurden die NRCF wie unter 2.2.1. mit Trypsin von der Vorkulturplatte entfernt und nach dem Zentrifugieren in je 1 ml Kryomedium (NRCF-Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO, sterilfiltriert (Sarstedt, 83.1826.001)) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen (Cryo.s™ - Greiner-Bio-One, Kremsmünster) überführt. Die Einfrierröhrchen wurden anschließend in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Mr. Frosty™ - Nalgene®, Penfield) bei -80 °C über Nacht langsam (-1 °C / min) eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Verwendung wurden die NRCF durch Schütteln im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und so schnell als möglich in NRCF-Medium aufgenommen.

2.2.3. ADENOVIRALE INFEKTION

Zur Infektion mit Adenoviren wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies NRCF-Medium (DMEM mit Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ ml Streptomycin) ausgetauscht und mit der ent-



ABBILDUNG 9 - Sequenz des für den Ad-PDE2A3 verwendete linearisierte Konstrukt. **GFP ist zur visuellen Infektionskontrolle integriert.**

sprechenden Menge Virus versetzt. Hierbei wurde von Ad-EPAC2 (für FRET) stets eine MOI von 30 verwendet, für das Ad-eGFP und Ad-PDE2 eine MOI von 100 (FRET), 300 (Blots) oder 400 (ECT). Die transfizierten Zellen oder ECTs wurden anschließend in einem wasserdampfgesättigten Virusinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 Stunden (Zellen) oder 4 Tage (ECT) kultiviert und anschließend für die Versuche verwendet. Ad-EPAC2 war eine freundliche Spende von Dr. Viacheslav Nikolaev (Nikolaev 2004), Ad-PDE2 wurden von Julius Emons hergestellt und Ad-eGFP aus einem leeren pAdTrack-CMV Plasmid von Dr. Christina Würtz.

2.2.4. BEHANDLUNG DER KARDIOFIBROBLASTEN MIT WIRKSUB-

STANZEN

Für die Stimulation der NRCF mit den jeweils angegebenen Substanzen wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies NRCF-Medium (DMEM mit Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) ausgetauscht und über Nacht bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Sodann wurde die gelöste Substanz in Medium vorverdünnt und die entsprechende Menge zu den Zellen gegeben. Bei DMSO als Lösungsmittel, wurde auch stets die entsprechende Menge an reinem DMSO für die Kontrollgruppe in Medium verdünnt. Die Wirkkonzentration der Stoffe kann Tabelle 2 entnommen werden. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 37 °C / 5 % CO inkubiert, zur Bestimmung cAMP/cGMP-Konzentration (2.4.6.), bzw. 24 h für proteinbiochemische Analysen.

2.3. 3D-Zellkultur

2.3.1. KONSTRUIERTES BINDEGEWEBE (ECT)

Zur Herstellung von Konstruiertem Bindegewebe (ECT) wurden NRCF in 175 cm²-Flaschen (Sarstedt, 83.1812.002) angezogen und bei Erreichen der Konfluenz mit Adenovirus infiziert (Ad-eGFP MOI 400, Ad-PDE2 MOI 400). 4 - 6 Stunden nach Virusinfektion wurden die Zellen vom Boden der Flasche trypsiniert (2.2.1.) und das Zellpellet nach der Zentrifugation auf eine Zellkonzentration von 11,5*10⁶ NRCF pro ml gebracht. Sodann wurden auf Eis 500 µl 2x EHM-Medium (133 mg DMEM-Pulver, 1 ml Pferdeserum, 0,2 ml Hühnerembryoextrakt (CEE), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 3,7 ml H₂O, sterilfiltriert (Sarstedt, 83.1826.001)) mit 450 µl Rattenschwanzkollagen vermischt und der pH-Wert mit 80 µl 0,1 N NaOH neutralisiert. Dies wurde mit 970 µl der Zellsuspension versetzt und je 450 µl davon in jede Vertiefung einer Maus-EHM-Form (Tiburcy 2013) gegeben. Die Masse härtete anschließend für 45 Minuten bei 37 °C aus. Anschließend wurden die EHM-Formen mit je 5 ml EHM-Medium (DMEM 1 g/l Glukose, 10 % Pferdeserum, 2 % CEE, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) beschickt und das Medium täglich gewechselt. Nach 4 Tagen wurden die nun kondensierten ECT-Ringe in den Kraftaufnehmer einer Isolierten Organapparatur IOA - 5301 (Fa. Föhr Medical Instruments, Seeheim) eingehängt und in 37 °C warmer Tyrode-Lösung (120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,05 mM MgCl,, 0,2 mM CaCl,, 0,42 mM NaH₂PO₄, 22,6 mM NaHCO₃, 5,05 mM Glukose, 0,56 mM Ascorbinsäure) in 30 Sekunden-Schritten die Zugkraft auf die Ringe um je 125 µm so lange erhöht, bis sich ein Reißen der Ringe zeigte. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Amon32/BeMon32 (Ingenieurbüro Jäckel, Deutschland).

2.3.2. KONSTRUIERTER HERZMUSKEL (EHM)

Die Herstellung des Konstruierten Herzmuskels (EHM) erfolgte aus dem Zellgemisch, welches bei der Präparation neonataler kardialer Rattenzellen (2.1.1.) vor dem Auftragen auf die Vorkulturplatte gewonnen wurde. Es enthielt somit (zum Großteil) Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten. Die Herstellung erfolgte dann wie die Herstellung der ECT-Ringe (2.3.1.), allerdings bestand jeder Ring aus 195 μ l Rattenschwanzkollagen, 195 μ l 2x EHM-Medium, 43 μ l 0,1 N NaOH, 100 μ l Matrigel (BD, 356234), 2*10⁶ Zellen und es wurde je 900 μ l in jede Vertiefung einer Ratten-EHM-Form (Tiburcy 2013) gegeben. Die Masse härtete anschließend für 45 Minuten bei 37 °C aus, die EHM-Formen wurden anschließend mit je 5 ml EHM-Medium (DMEM 1 g/l Glukose, 10 % Pferdeserum, 2 % CEE, 100 U/ ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin) beschickt und das Medium täglich gewechselt. Nach 4 - 5 Tagen wurde das EHM in einen statischen Spanner (Tiburcy 2013) eingespannt und für weitere 5 Tage in EHM-Medium kultiviert.

Zur Messung wurden die EHMs in den Kraftaufnehmer einer Isolierten Organapparatur IOA - 5301, in 37 °C warmer Tyrode-Lösung (siehe 2.3.1.), eingehängt und die Kalziumkonzentration auf 1 mM erhöht um eine hohe Kraftentwicklung zu garantieren. Über die Elektroden der IOA-5301 wurde die Kontraktion der EHMs mit einem Strom von 150 mA (2 Hz, Pulsbreite 5 ms, Einschaltzeit 0 sec.) stimuliert und nach 10 Minuten die Vordehnung so lange gesteigert, bis jedes EHM seine maximale Kraftentwicklung L_{max} (vergl. Frank-Starling) erreicht hatte. Danach wurde die Tyrodelösung abgepumpt und gegen neue (0,2 mM Ca2+) ersetzt, 8 Minuten inkubiert, die basal vorhandene Kalziumkonzentration von 0,2 mM auf 0,4 mM erhöht, 8 Minuten inkubiert, 100 nM Isoprenalin zugegeben, wieder 8 Minuten inkubiert, 1 µM BAY 60-7550 zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Die Änderungen der Zugkraft bei jeder Kontraktion ("twitch tension") und die Amplitude der Kontraktion ("twitch amplitude") wurden mit Hilfe von Amon32/Be-Mon32 aufgezeichnet und ausgewertet.

2.3.3. HERSTELLUNG KOLLAGEN TYP I

Das für die 3D-Kulturen benötigte Kollagen wurde aus Rattenschwänzen adulter Wistar-Kyoto-Ratten (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, USA) gewonnen. Hierzu wurden 4 - 6 Rattenschwänze mit 70 % Ethanol gewaschen und desinfiziert. Anschließend wurden die Rattenschwänze der Länge nach geöffnet, die Sehnen extrahiert und in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) gesammelt. Sie wurden mit frischem EBSS gewaschen, in 100 ml 0,1 % Essigsäure überführt und über Nacht bei 4 °C zu einer zähflüssigen Masse gerührt. Anschließend wurde die Masse bei 4 °C für 1 - 2 h bei 20.000 g zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor 19, Krefeld) und der Überstand abgenommen. Nun wurde bei 4 °C unter Rühren eine 25 %ige NaCl-Lösung dazu gegeben, bis eine NaCl-Konzentration von 4 % erreicht war. Anschließend wurde alles über Nacht bei 4 °C ruhen gelassen. Es wurde abermals bei 4 °C zentrifugiert (5 min, 10.000 g, Beckman J2-21, Rotor 19), der Überstand verworfen, das Pellet in 0,1 %iger Essigsäure aufgenommen und unter Rühren bei 4 °C gelöst. Anschließend wurde gegen 0,1 %ige Essigsäure über Nacht dialysiert (MWCO 12.000 – 14.000, SERVAPOR[®], #44147), auf eine Konzentration von 4,2 mg/ml gebracht und das Kollagen bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Der pH lag bei ca. 3.

2.3.4. HERSTELLUNG DES HÜHNEREMBRYO-EXTRAKTES (CEE)

Die Gewinnung des CEE erfolgte aus Eiern des 7. bis 9. Bruttages der Landesversuchsanstalt für Kleintierzucht Kitzingen. 60 Eier wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert, die Eihülle am runden Pol geöffnet und der Embryo entnommen. Die dekapitierten Embryos wurden in 150 ml CBFHH (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,3 mM Na₂HPO₄, 1 g/l Glukose, 20 mM HEPES, pH 7,4, sterilfiltriert) gesammelt und auf Eis mit einem Polytron PT-MR 1600E (Kinematica AG, Schweiz) homogenisiert. Das Homogenat wurde auf 300 ml mit CBFHH aufgefüllt und für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, 60 g, 4 °C), die Überstände wurden gesammelt. Das Pellet wurde erneut mit Hilfe des Polytrons homogenisiert, zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Das CEE wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4. Proteinbiochemie

2.4.1. LYSE DER ZELLEN

Zur proteinbiochemischen Aufarbeitung wurden die NRCF auf den 6-Wellplatten oder 10 cm Schalen mit auf 37 °C vorgewärmter Dulbeccoʻs phosphatgepufferter Saline (DPBS) gewaschen und mit einer entsprechenden Menge (300 µl auf 10 cm

Platte, 100 µl pro 6-Well) an eiskaltem Lysepuffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,15 % SDS, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, Roche PhosSTOP Phosphatase Inhibitor, Roche Complete Protease Inhibitor) versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Sodann wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, 83.1830) von der Platte entfernt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt, welches anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, 4°C, 14000 g) wurde. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.4.3.) und mit Lämmli-Puffer (2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % Glycerol, 100 mM DTT, 40 mM Tris-HCl, pH 6,8) für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe bei -20°C gelagert oder direkt für eine SDS-PAGE (2.4.4.) verwendet.

2.4.2. LYSE DES HERZGEWEBES

Zur Aufarbeitung der entnommenen Herzen für eine proteinbiochemische Untersuchung wurde das in flüssigem Stickstoff eingefrorene Herz durch Druck mechanisch pulverisiert und je 30 mg des Pulvers in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde auf Eis 300 µl des Lysepuffers (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,15 % SDS, 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, Roche PhosSTOP Phosphatase Inhibitor, Roche Complete Protease Inhibitor) gegeben und eine Stahlkugel mit 5 mm Durchmesser zugesetzt (Qiagen, 69989, Venlo, Niederlande), um das Gewebe mit Hilfe eines TissueLyzers II (Qiagen, 85300) weiter zu zerkleinern (20 Hz, 2 x 30 sec, -20 °C). Nach Zentrifugation für 10 Minuten (Eppendorf Centrifuge 5417R, 14.000 g, 4°C) wurde der Überstand in ein weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (2.4.3.) und die Proben für eine SDS-PAGE aufgearbeitet (2.4.4.).

2.4.3. BRADFORD-MESSUNG

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zell- oder Herzlysate wurde mit Hilfe der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Hierzu wurden 5 µl des Lysates mit 200 µl Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, Roth) und 795 µl 0,1 M NaOH in einer 1 cm-Polystyrol-Küvette (Sarstedt, 67.742) versetzt und die Absorption bei 595 nm mit einem BioPhotometer 6131 (Eppendorf) bestimmt. Die Kalibriergerade wurde mit IgG aus Rinderserum (Sigma-Aldrich, I5506) mit den Konzentrationsstufen 0, 85, 170, 340, 510, 680, 850 und 1020 µg/ml erstellt. Die Proteinkonzentration in µg/ml wurde vom Gerät errechnet und ausgedruckt.

2.4.4. SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT

Von den in Lämmli-Puffer aufgekochten Proben wurde je ein Aliquot so verdünnt, dass sie dieselbe Proteinkonzentration aufwiesen und stets dasselbe Volumen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Untersuchung auf α-SMA je 5 µg Protein, für PLB und PLB-Ser16 je 60 µg und für alle anderen Proteine je 40 µg Protein. Für die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele und der verwendeten Konzentration, siehe Tabelle 3. Die Gele wurden in einem Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System (Bio-Rad) in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) zuerst für einige Minuten bei 80 - 100 V laufen gelassen, danach bei 140 V. Sodann wurde das Polyacrylamidgel entnommen und in ein Mini Trans-Blot Cell-System (BioRad) überführt. Für Blots auf PLB oder PLB-Ser16 wurde eine PVDF-Membran (Amersham Hybond[™]-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet, für Blots auf TnI und Phospho-TnI eine Nitrozellulosemembran mit 0,2 µm Porengröße (Optitran BA-S 83, GE Healthcare) und für alle anderen Blots eine Nitrozellulosemembran mit 0,4 µm Porengröße (Whatman 10401196 Protran, BA85). Geblotet wurde unter Eiskühlung im Nassverfahren in Transferpuffer (20 % Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin) für eine Stunde bei 350 mA. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran einmal mit VE-Wasser gewaschen und die an der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S-Färbelösung (0,2 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure, 3 % 5-Sulfosalicylsäure) sichtbar gemacht und in Höhe des gesuchten Proteins in Streifen geschnitten. Diese Membranstrei-

fen wurden in Tween-haltiger Tris-gepufferter Saline (TBST, 0,1 % Tween 20, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) entfärbt und anschließend für 1 - 2 Stunden in 5 %iger Milchpulverlösung inkubiert. Anschließend kurz in TBST gewaschen und über Nacht mit dem primären Antikörper in TBST bei 4 °C inkubiert. Sodann wurden die Membranstreifen dreimalig für 5 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper in TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden sie abermals in TBST gewaschen (zweimalig je 5 Minuten) und die Banden mit Hilfe der Luminol-haltigen Substrate SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat (Thermo Scientific, Waltham, USA) bzw. SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat (Thermo Scientific) sichtbar gemacht und an einem VersaDoc 4000 MP (BioRad) CCD-Bildwandler dedektiert. Dargestellt und quantifiziert wurden die Banden mit Hilfe der Quantity One 4.6.9 Software (BioRad).

2.4.5. FIXIERUNG DER ZELLEN UND MIKROSKOPIE

Zur Mikroskopie wurden die auf einer 12 Well-Platte (Greiner-Bio-One, 665180) angezogenen Zellen zuerst mit 37 °C warmem DPBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimalig mit DPBS gewaschen und für 30 Minuten bei 4 °C in Blockingpuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100, 1 % BSA, 5 % Ziegenserum, pH 7,5) inkubiert. Nun wurde abermals zweimalig mit zimmerwarmem DPBS gewaschen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 1:100-Verdünnung des primären Antikörpers in Antikörper-Lösungspuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 1 % BSA, 0,1 mM EGTA, 1 mM MgCl, pH 7,5) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit zimmerwarmem DPBS wurden der Primärantikörper und/oder ein Farbstoff (DAPI, Phalloidin) in Antikörper-Lösungspuffer zugegeben. DAPI (Invitrogen, D1306, Carlsbad) in einer Verdünnung von 1:1000, Alexa-546-antimouse (Invitrogen, A11003) 1:500, Alexa-546-anti-rabbit (Invitrogen, A11010) 1:500 und Alexa-Fluor-633-Phalloidin (Invitrogen, A22284)1:40. Sodann wurde abermals dreimalig mit zimmerwarmem DPBS gewaschen, anschließend 1 ml DPBS je Well dazugegeben und die Zellkulturplatten bei 4 °C wenige Tage gelagert oder sofort an einem motorisierten Auflichtfluoreszenzmikroskop IX81-ZDC (Olympus, Tokio, Japan) mikroskopiert.

2.4.6. BESTIMMUNG DES CAMP- UND CGMP-GEHALTES

Für die Ermittlung des basalen Gehaltes an cGMP wurde ein cGMP Chemiluminescent Immunoassay Kit (Biotrend, K020-C1) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Bestimmung des basalen Gehaltes an cAMP erfolgte mit Hilfe eines Total Cyclic AMP Immunoassay Kit (Biotrend, BT900-066, acetyliertes Protokoll), ebenfalls nach Anleitung des Herstellers. Ausgelesen wurden die 96 Well-Platten jeweils an einem FlexStation 3 Mikroplattenleser (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA), die Daten dargestellt mit Hilfe der Soft Max Pro 5.4. Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und ausgewertet mit MS Excel (Microsoft, Redmond, USA).

2.5. FRET-Messung

2.5.1. FRET-MESSUNG

Zur cAMP-Bestimmung mittels FRET diente ein zytosolisches CFP-YFP-EPAC2-Konstrukt, welches bei NRCF über ein Adenovirus in die Zelle verbracht (Nikolaev 2004) und bei AMCM durch transgene Tiere exprimiert wurde (Calebiro 2009). Zur FRET-Messung an NRCF wurden diese in 6-Well-Platten auf autoklavierte runde Glasplättchen mit 24 mm Durchmesser (631-0161, VWR, Radnor, USA) dünn ausgesät und mit den entsprechenden Adenoviren infiziert (siehe 2.2.3.). Für FRET-Messungen an adulten Kardiomyozyten wurden die Glasplättchen vorher mit 20 µg/cm² Laminin beschichtet. Die Glasplättchen mit den adherierten Zellen wurden in eine Halterung eingesetzt und mit je 400 µl Fibroblasten-FRET-Puffer (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM

MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM D-Glucose, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 (Miller 2011)) oder Kardiomyozyten-FRET-Puffer (144 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,3 (Börner 2011)) versetzt. Alle zugegebenen Substanzen wurden ebenfalls in demselben Puffer gelöst. Die FRET-Apparatur bestand aus einem Olympus IX71 Mikroskop mit Olympus UPlanSApo 40x 1.35 Öl Objektiv, einer Polychrome V Lichtquelle, einem DV2 DualView Strahlteiler (Photometrics, USA) und einer Andor iXon3 885 Low Light EMCCD Kamera (Andor, Irland). Es wurde das YFP/CFP-Emissionsverhältnis bei Anregung mit 436 nm (Filter YFP 535 ± 15 nm, CFP 480 ± 20 nm) ermittelt. Die Daten wurden mittels MetaFluor Software dargestellt und mit MS Excel ausgewertet. Der mit Hilfe von HEK-Zellen ermittelte und mit einberechnete Korrekturfaktor des Mikroskops lag bei B = 0,4338 (vergl. 1.7.).

2.6. Transgene Techniken

2.6.1. TRANSGENE MÄUSE

Zur Kardiomyozyten-spezifischen PDE2-Überexpression wurde von Julius Emons ein Plasmid entworfen (Abb. 10), welches unter der Kontrol-



ABBILDUNG 10 - Plasmid αMHC-PDE2A3 das für die Konstruktion der PDE2A3-überexprimierenden Mauslinie mit *Spel* linearisiert und zur Pronukleusinjektion verwendet wurde.

le eines humanen aMHC-Promotors eine murine PDE2A3-Sequenz besitzt. Dieses Plasmid wurde von Danilo Seppelt kloniert, mittels SpeI linearisiert und für eine Pronukleusinjektion aufgereinigt. Das aufgereinigte 10,2 kb große Fragment wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen (Frau Dr. Ursula Fünfschilling) durch Pronukleusinjektion in den paternalen Pronukleus von Zygoten aus männlichen und weiblichen FV-B/N-Spendermäusen eingebracht. Die daraus hervorgegangenen Mäuse wurden genotypisiert und die aMHC-PDE2A3-positiven Tiere am Europäischen Neurowissenschaftlichen Institut Göttingen (ENI) mit C57BL6/J-Tieren über mehrere Generationen auf einen C57BL6/J-Hintergrund zurückgekreuzt. Für Versuche, Operationen, echokardiographische Untersuchungen (2.7.1.) und Organentnahmen (2.7.3.) wurden die Tiere in die Tierexperimentelle Einrichtung (ZTE) Göttingen transferiert.

Für die Versuche mit adulten Kardiomyozyten (AMCM) wurden Mäuse mit einem CFP-YFP-EPAC2-FRET-Konstrukt, welches unter der Kontrolle eines β -Aktin-Promotors in allen Zellen exprimiert wird, und von Herrn Dr. Nikolaev zur Verfügung gestellt wurde (Calebiro 2009), mit PDE2A3-transgenen Mäusen verpaart. Das Resultat waren Tiere, die nur den FRET-Sensor enthielten (WT) und Tiere mit dem FRET-Sensor und einer PDE2A3-Überexpression (TG).

2.6.2. GENOTYPISIERUNG

Zur Ermittlung des Genotyps wurden 2-5 mm lange Schwanzspitzen von 3 - 4 Wochen alten Mäusen verwendet. Die Schwanzspitzen wurden von den Tierpflegern geschnitten; die Mäuse wurden während 3 - 4 Tagen zuvor mit 8 mg/l Metamizol im Trinkwasser (Novaminsulfon 500, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) analgesiert. Zur Identifikation der Tiere diente ein eigener Ohrlochcode der Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) Göttingen. Die Extraktion der DNA aus den Schwanzspitzen und die PCR erfolgte mit Hilfe eines REDExtract-N-Amp[™] Tissue PCR Kits (Sigma-Aldrich, XNAT, Missouri) nach Anleitung des Herstellers. Der PCR-Ansatz bestand aus 1 μ l DNA in 10 μ l Gesamtansatz. Die Initialisierung der PCR-Reaktion erfolgte bei 95 °C für 5 Minuten, die PCR-Reaktion bestand dann aus 32 Zyklen von: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec., Annealing bei 60 °C für 30 sec. und Elongation bei 72 °C für 45 sec. Die finale Elongation wurde bei 72 °C für 5 Minuten durchgeführt. Es wurden folgende Primer verwendet um ein 870 bp großes Fragment zu erhalten:

aMHC_for: 5'-CGGCACTCTTAGCAAACCTC-3' (Forward-Primer)

PDE2a_rev: 5'-AAGGGCTTTCCCAGTAGGTC-3' (Reverse-Primer)

Die Genotypisierung wurde von Ursel Leonhardt, Daniela Liebig-Wolter oder mir durchgeführt.

2.7. Tierexperimentelle Techniken

2.7.1. ECHOKARDIOGRAPHIE

Zur Echokardiographie wurden die Mäuse mit Hilfe einer Induktionskammer mit 3 Vol.% Isofluran narkotisiert und eine ventral gelegene Stelle des Thorax enthaart (Veet, Reckitt Benckiser, Slough, UK). Die weitere Narkose der Maus wurde über eine Atemmaske eines Isofluranverdampfers (VEVO Compact Dual Anesthesia System, VisualSonics, Toronto, Kanada) unter 1 - 1,5 Vol.% Isofluran aufrecht erhalten. Zur Stabilisierung der nötigen Körpertemperatur wurde die Maus auf einer beheizbaren VisualSonics Mausplattform fixiert, mit einer Rotlichtlampe zusätzlich gewärmt und die Temperatur rektal überwacht. Zur Sicherstellung der elektrischen Leitfähigkeit zwischen Maus und den Elektroden der Mausplattform wurde SIGNA-GEL Electrode Gel (Parker Labs, Fairfield, USA) verwendet. Die echokardiografische Untersuchung erfolgte unter Zuhilfenahme des Ultraschallgels EcoGel 100 (Eco-Med, Mississauga, Kanada) an einem VEVO 2100 Imaging System (VisualSonics, Toronto, Canada) und einem MicroScan MS400 Hochfrequenz-Linearschallkopf (18 - 38 MHz, VisualSonics) bei einer Frequenz von 30 MHz. Zuerst wurde im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt, sodann der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse. In derselben Achse wurden ebenfalls Aufnahmen im M-Mode erstellt. Es wurde jeweils nur der linke Ventrikel untersucht. Die Echokardiogramme wurden von Roland Blume oder Marcel Zoremba erstellt und von Beate Knocke oder mir mit Hilfe der VEVO 2100 Software v. 1.6.0 ausgewertet. Für Aufnahmen unter Dobutaminstress wurden 1 μ g/g KG und/oder 10 μ g/g KG Dobutaminhydrochlorid intraperitoneal injiziert.

2.7.2. TAC-OPERATION

Zur Konstriktion der transversalen Aorta wurden die entsprechenden Mäuse 2 bis 3 Tage vor der Operation mit 8 mg/l Metamizol (Novaminsulfon 500, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) im Trinkwasser analgesiert und 1 - 2 Tage vorher ein Echokardiogramm zur Bestimmung der präoperativen Herzfunktion mit und ohne Dobutamin angefertigt. 30 Minuten vor der Operation wurde den Tieren 0,12 µg/g KG Buprenorphin (Temgesic® Injection, Reckitt Benckiser, Slough, UK) i.p. verabreicht, direkt vor der OP nochmals 0,12 µg/g KG subkutan. Dann wurde der Maus über eine Atemmaske 1 - 1,5 Vol.% Isofluran zur Narkose verabreicht. Sodann wurde sie mit Leukosilk (Bsn medical GmbH, Hamburg, Deutschland) auf einer Wärmeplatte fixiert und der Hals und der obere Thorax enthaart (Veet, Reckitt Benckiser, Slough, UK). Nun wurde zuerst die Haut oberhalb des oberen Endes des Brustkorbs 1 cm eingeschnitten und die Schilddrüse zur Seite geschoben. Die Muskeln wurden nun mit einer spitzen Pinzette über und entlang der Luftröhre geöffnet und das Brustbein mit einer Schere 2 - 5 mm eingeschnitten. Die Thymusdrüse wurde bei Seite gelegt und in das Bindegewebe unterhalb des freipräparierten Aortenbogens, zwischen Arteria carotis communis dextra und Arteria carotis communis sinistra, mit einer angerauten 26 G Kanüle eingedrungen. Nun wurde hier ein Faden (LOOK-SP211, Angiotech) mit einem speziell angefertigten Fadenhalter hindurch gezogen und ein lockerer Doppelknoten vorgelegt. Die angeraute 26 G Kanüle wurde vorsichtig zwischen Aortenbogen und den Knoten gelegt und die transversale Aorta durch

zwei gegenläufige feste Doppelknoten an die Kanüle gebunden. Nun wurde die Kanüle entfernt. Damit war die Aorta praktisch auf den äußeren Umfang der Kanüle eingeengt. Dann das Brustbein und danach die Haut vernäht (Prolene 6/0-C1, Ethicon Inc.). Nun wurde die Maus in einen Aufwachkäfig, auf einer Wärmeplatte, bis zum vollständigen Erwachen, gesetzt. Für weitere 7 Tage wurde die Maus zur Schmerztherapie mit 8 mg/l Metamizol im Trinkwasser versorgt. 1 - 3 Tage nach der OP wurde ein Dopplerecho angefertigt um den Grad der Stenose zu ermitteln. Danach erfolgte in Abständen von einer Woche je ein normales Echo, am Anfang ohne Dobutamin um die Mäuse zu schonen, an Woche 6 mit Dobutamin. Die TAC-OP wurde jeweils von Sarah Zafar durchgeführt.

2.7.3. ORGANENTNAHME UND BESTIMMUNG DER BIOMETRI-SCHEN PARAMETER

Zur Bestimmung der biometrischen Parameter wurde die Maus mit mind. 3 Vol.% Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Sodann wurde sie gewogen (ED153, Sartorius, Göttingen), die Fellfarbe notiert und ein 0,5 mm langes Stück der Schwanzspitze zur Genotypisierung entnommen. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz entnommen, in DPBS gespült, mit einem Stück Papier getrocknet, gewogen (ED153, Sartorius) und Atrium und Ventrikel separat in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurde die Lunge präpariert und ebenfalls gewogen. Ein Hinterlauf wurde abgetrennt, die Sehnen durchtrennt und die Tibia (Schienbein) freigelegt. Sodann wurde die Länge der Tibia vom proximalen bis zum distalen Knochenende (Epiphyse) mit Hilfe einer Schieblehre (Junior Taschenmessschieber, Mauser, Oberndorf, Deutschland) ermittelt. Die entnommenen Herzproben wurden bis zur weiteren Verwendung (Lyse und Westernblot) bei -80 °C gelagert.

2.7.4. ABBRUCHKRITERIEN

Um bei den Versuchstieren unnötiges Leiden zu verhindern (TierSchG), wurden klare Abbruchkriterien definiert. Durch diese klar definierten Kriterien wurde festgelegt, wann ein Tier dem Versuch entnommen wurde und wann nicht. Im Einzelnen wurde festgelegt, Tiere dem Versuch zu entnehmen, falls das Tier Lähmungen mehrere Gliedmaßen aufwies, das Tier innerhalb weniger Tage ≥ 15 % an Gewicht verlor oder wenn das Körpergewicht um 15 - 20 % von einem gesunden gleichaltrigen Tier desselben Stammes abwich, das Tier Tumore bildete, das Tier Verstümmelungen oder Verwundungen durch Artgenossen oder sich selbst aufwies, Operationswunden des Tieres trotz Behandlung nicht verheilten oder von sich selbst oder Artgenossen geöffnet wurden, das Tier Blutungen (aus Mund, Nase etc.) oder blutigen Kot aufwies, das Tier Anzeichen von starkem Schmerz (völlige Bewegungs- und Reaktionslosigkeit, Umfallen...) zeigte, das Tier vom Tierarzt als nicht therapierbar krank diagnostiziert wurde.

Bei anderen geringen Beschwerden oder bei unklaren Veränderungen im Verhalten wurde mit dem Tierarzt Rücksprache gehalten.

2.8. Statistik

2.8.1. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Umwandlung der gewonnenen Daten in eine grafische Darstellung und deren statistische Auswertung erfolgten mit Hilfe einer Statistiksoftware und dem darin enthaltenen Mann-Whitney-Test. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde jeweils als statistisch signifikant angesehen. Die Überlebensanalyse wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven durchgeführt. Es wurde hierzu GraphPad Prism 5.01 bzw. 6.0c (GraphPad Software Inc; San Diego) verwendet.

2.9. Verwendete Chemikalien, Substanzen und Antikörper

TABELLE 1 - GEBRAUCHSCHEMIKALIEN

Name	Summeformel	Molare Masse in g/mol	Vertreiber	Artikelnummer
2,3-Butandion-2-oxim (BDM)	C ₄ H ₇ NO ₂	101,1	Sigma-Aldrich	B0753
2-Propanol (Isopropanol)	C3H8O	60,1	Roth	6752.5
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	C ₇ H ₆ O ₆ S * 2 H ₂ O	254,22	Applichem	A0416
Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1	-	-	Roth	3029.1
Albumin Fraktion V (BSA)	-	-	Applichem	A1391
Ammoniumpersulfat (APS)	H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	228,2	BioRad	#161-0700
Ascorbinsäure	C ⁶ H ⁸ O ⁶	176,13	Applichem	A1052
b-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	78,13	Applichem	A1108
Bromphenolblau	$C_{19}H_{9}Br_{4}O_{5}SNa$	691,9	Sigma-Aldrich	B8026
Dimethylsulfoxid	C ₂ H ₆ OS	78,13	Sigma-Aldrich	D8418
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	177,99	Roth	4984
Direktrot 80	C45H26N10Na6O21S6	1373,07	Sigma-Aldrich	365548
Dithiothreitol (DTT)	C4H1002S2	154,25	Applichem	A1101
EGTA	C14H24N2O10	380,35	Applichem	A0878
Essigsäure	C2H4O2	60,05	Roth	6755.2
Ethylendiamintetraacetat-Dihydrat, Na-Salz (EDTA)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ * 2 H ₂ O	372,24	Applichem	A1104
Glukose	C ₆ H ₁₇ O ₆	180,16	Applichem	A0883
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,1	Applichem	A0970
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	75,07	Applichem	A1067
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238,31	Roth	HN77.4
Isofluran	C ₃ H ₂ CIF ₅ O	184,49	Abbott	05260-05
Kaliumchlorid	КСІ	74,55	Roth	HN02.3
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,09	Roth	P018.2
Kaliumhydrogenkarbonat	KHCO3	100,12	Roth	P748.2
Kalziumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	147,02	Merck	2382
Laminin	-	-	Sigma-Aldrich	L2020
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	Applichem	A4425
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246,48	Merck	A171286
Methanol	CH₄O	32,04	Roth	8388.6
Milchpulver	-	-	Applichem	A0830
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Roth	3957
Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	137,99	Merck	6346
Natriumdodecylsulfat (SDS)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	288,38	Applichem	A2572
Natriumfluorid	NaF	41,99	Sigma-Aldrich	S7920
Natriumhydrogenkarbonat	NaHCO ₃	84,01	Roth	0965.2
Natriumhydroxyd	NaOH	39,99	Roth	6771.1
Nonidet P40 (NP-40)	(C ₂ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O	-	Fluka	56741
Paraformaldehyd	(CH ₂ O) _n	-	Sigma-Aldrich	P6148
Phenolrot	C ₁₉ H ₁₃ O₅SNa	376,4	Sigma-Aldrich	P5530
Pikrinsäure	C ₆ H ₃ N ₃ O ₇	229	Sigma-Aldrich	P6744
Ponceau S	C ₂₂ H ₁₂ Na ₄ N ₄ O ₁₃ S ₄	760,56	Applichem	A1405
Salzsäure, 37%	HCI	36,46	Applichem	A0659
Taurin	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125,2	Roth	4721.2
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	C ₆ H ₁₆ N ₂	116,24	BioRad	#161-0801
Trifluoressigsäure	C ₂ HF ₃ O ₂	114,02	Roth	P088
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,14	Applichem	A1086
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	647	Sigma-Aldrich	T8787
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	1227,72	Roth	9127.1

TABELLE 2 - FEINCHEMIKALIEN

TGF-β	Proteinkinase-Inhibitor (PKI)	(SNP)	Natrium-Nitroprussid	L-(-)-Norephinephrin	Isoprenalin (ISO)		ICI 118,551		Forskolin		ESI-09		(Dobu)	Dobutamin-Hydrochlorid	Peptid (CNP)	C-Typ Natriuratisches	CGP 20712 Dihydrochlorid		BAY-60-7550		Peptid (ANP)	Atriales Natriuretisches	5,6-DM-cBIMP		-thin (IBMX)	3-Isobutyl-1-methylxan	Angiotensin II (Ang II)		Name
13000	2223	298		337,28	211, 248 (*HCI)		314		411		331		301		2198		567		477		3080		363		222		1046		Molare Masse in g/mol
bps bioscience	SantaCruz	Roth		Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich		Tocris		Applichem		BioLog		gmbh	hameln pharma plus	Tocris		Tocris		Biomol		Bachem		BioLog		Applichem		Tocris		Vertreiber
90900-1	sc-201159	HN34		A9512	15627		#0821		A2165		B133		225055		#3520		#1024		Cay10011135-5		H-2095.1000		D001		A0695		1158		Artikelnummer
1 ng, 10 ng, 30 ng	1 µM	1 mM (FRET), 40 μM (Blots)		100 µM	100 nM, 1 µM		50 nM		25 µM		10 µM, 30 µM		kg (= Dobu high)	1 mg/kg (= Dobu low), 10 mg/	100 nM		100 nM		100 nM		100 nM (FRET), 1 µM (Blots)		1 µM, 10 µM		150 µM		1 mM, 10 mM, 30 mM		Eingesetzte Konzentration
0,05 M Essigsäure (pH 3,0)	Wasser	Wasser		Wasser	Wasser		Wasser		DMSO		DMSO		Wasser		Wasser		Wasser		DMSO		Wasser		DMSO		DMSO		Wasser		Lösungsmittel
Aktiviert TGFBR1 und TGFBR2	Inhibitor der PKA	zyklase	Aktivator der zytosolischen Guanylat-	Aktiviert α1- und β-Adrenozeptoren	β-Adrenozeptoren	Noradrenalin-Derivat, aktiviert nur	nozeptors	Selektiver Antagonist des β2-Adre-	cAMP	Adenylatzyklase-Aktivator, erhöht	EPAC1 und EPAC2	Membranpermeabler Inhibitor der	zeptoren	Aktiviert α 1-, β 1- und β 2-Adreno-	NPRB-Aktivator, erhöht cGMP		nozeptors	Selektiver Antagonist des β1-Adre-	hibitor	Hochselektiver und potenter PDE2-In-	Guanylatzyklase	Aktivator der membranständigen	PDE2	Membranpermeabler Aktivator der	hibitor	Kompetitiver nichtselektiver PDE-In-	cGMP	AT1R- und AT2R-Aktivator, erhöht	Wirkung

TABELLE 3 - ANTIKÖRPER

Primärantikörper	Konjugat	Konzentration	Hersteller, Artikelnummer	Bandengröße in kDa	% Gel
alpha-Tubulin	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich, T9026	55	10
Calsequestrin (CSQ)	Kaninchen	1:2500	Thermo, #PA1-913	55	10
CTGF (L-20)	Ziege	1:200	Santa-Cruz, sc-14939	39	10
GAPDH (G-9)	Maus	1:1000	Santa-Cruz, sc-365062	36	10
Glattmuskelaktin (α-SMA)	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich, A5228	42	10
Myosin-Bindeprotein C (cMyBP-C) pSer282	Kaninchen	1:5000	Enzo Life Science, ALX-215-057-R050	130-150	10
Myosin-Bindeprotein C 3 (cMyBP-C3)	Kaninchen	1:5000	Abcam, ab133499	130-150	10
PDE2A	Kaninchen	1:1000	FabGennix, PDE2A-101AP	105	10
Phospholamban	Maus	1:5000	Badrilla Ltd., A010-14	6-28	15
Phospholamban Phospho Serine-16	Kaninchen	1:5000	Badrilla Ltd., A010-12	6-28	15
Phospholamban Phospho Threonine-17	Kaninchen	1:5000	Badrilla Ltd., A010-13	6-28	15
RyR2	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, HPA020028-100UL	565	6
RyR2-Ser2808	Kaninchen	1:5000	Badrilla Ltd., A010-30	565	6
SERCA2A	Ziege	1:200	Santa-Cruz, sc-8094	110	10
Troponin I	Maus	1:1000	Millipore, MAB3150	14-18	15
Troponin I, Phospho-Ser23/24	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, #4004S	25	15
Sekundärantikörper	Konjugat	Konzentration	Hersteller, Artikelnummer		

TABELLE 4 - MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR ZELLKULTUR

Name	Vertreiber	Artikelnummer
DMEM, 1 g/l Glukose mit Pyruvat	Gibco	21885
DMEM, 1 g/l Glukose, für EHM-Medium	Biochrom	F0415
DMEM, 4,5 g/l Glukose	Gibco	61965
DMEM-Pulver	Gibco	52100
Dulbecco`s phosphatgepufferte Saline (DPBS)	Gibco	14190
EBSS	Gibco	14155
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco	10270
MEM NEAA	Gibco	11140
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Gibco	15140
Pferdeserum (HS)	Gibco	16050
Trypsin, 0,25 %	Gibco	25200

anti-Kaninchen anti-Maus anti-Ziege

HRP POX

1:20000 1:20000 1:5000

Jackson

NmunoResearch, 111-035-045 Sigma-Aldrich, A3682

Santa-Cruz, sc-2020

III. ERGEBNISSE

Die in der Einleitung skizzierten Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Mehel 2013) legen nahe, dass die myokardiale PDE2 im insuffizienten Herzen eine wichtige Rolle spielt. Es sollte daher die Funktion der PDE2 im Herzen genauer untersucht werden. Zuerst *ex vivo* auf zellulärer Ebene und in 3D-Gewebskulturen (EHM) und nachfolgend *in vivo*, das heißt im Mausmodell.

3.1. Funktion der PDE2 im kardialen Fibroblast

3.1.1. VERGLEICH DER PDE2-EXPRESSIONSMUSTER IM KARDIA-

LEN MYOZYTEN UND FIBROBLASTEN

Das Herz besteht aus einer Reihe von verschiedenen Zelltypen. Den Hauptteil machen Kardiomyozyten (CM) und Kardiofibroblasten (CF) aus. Der erste Schritt war daher zu untersuchen, ob sich die kardiale PDE2-Expression in CM und CF unterscheidet. Hierzu wurden unstimulierte neonatale kardiale Rattenmyozyten (NRCM) und -fibroblasten (NRCF) durch Zellpräparation (2.1.1.) gewonnen, die NRCF für einige Tage bei -80°C eingefroren (2.2.2.) um die Myozyten abzutöten, die Zellen lysiert (2.4.1.) und auf PDE2 geblottet (2.4.4.). Um die Reinheit der Zellen zu kontrollieren wurde ein Protein ausgewählt, das nur in einem Zelltyp vorkommt, aber nicht in dem anderen (Markerprotein). Für die Fibroblasten wurde Prokollagen gewählt, bei den Myozyten CSQ. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung (Ladekontrolle) wurde GAPDH verwendet.

Man erkennt (Abb. 11) eine fast drei Mal so hohe PDE2-Expression in den NRCF gegenüber den NRCM. Die Zellpopulationen liegen dabei äußerst rein vor und die Proteinbeladung aller Proben war ähnlich.





ABBILDUNG 11 · Kardiale PDE2-Expression in neonatalen Rattenkardiofibroblasten (NRCF) und Kardiomyozyten (NRCM). (A) Repräsentative Immunoblots mit Prokollagen I und Calsequestrin (CSQ) als Markerproteine für Fibroblasten und Myozyten. (B) Quantifizierung der PDE2-Expression, normalisiert auf GAPDH, n = 5. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. NRCM.

Ergebnisse



ABBILDUNG 12 • Lokalisierung der rekombinanten PDE2 im kardialen Fibroblasten der neonatalen Ratte, visualisiert mit Immunofluoreszenz. Der Kern wurde mit DAPI gefärbt und die EGFP-Epifluoreszenz zeigt positive Virus-Infektion an.

3.1.2. LOKALISIERUNG DER KARDIALEN PDE2 IM FIBROBLAST

Die PDE2 wurde mittels eines rekombinanten Adenoviruses (2.2.3.) für PDE2 und EGFP in den kardialen Fibroblasten überexprimiert. Die PDE2-Überexpression war nötig, da die Konzentration der endogenen kardialen PDE2 zu gering für eine Immunfärbung ist. Die überexprimierte PDE2 wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Bilder an einem Auflichtfluoreszenzmikroskop aufgnommen (2.4.5.). Das EGFP diente als visuelle PDE2-Expressionskontrolle. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt ein vorwiegend zytosolisches Vorkommen der überexprimierten PDE2 und eine zusätzliche Akkumulation an der perinukleären Membran (Abb. 12).

3.1.3. BASALE CAMP-KONZENTRATION UND PROFIBROTISCHE FAKTOREN BEI KARDIALER PDE2-ÜBEREXPRESSION

Da die PDE2 den Spiegel des Botenstoffs cAMP mit höherer Umsatzrate als den von cGMP beinflusst, stellte sich zuerst einmal die Frage wie sich eine PDE2-Überexpression auf den basalen cAMP-Spiegel auswirkt. cAMP hemmt u.a. die Myofibroblastendifferenzierung und damit die Kollagensynthese, aber auch die CTGF-Expression (Swaney 2005). Es wurde daher untersucht, wie sich der zu erwartende veränderte cAMP-Spiegel der PDE2-Überexpression auf die profibrotischen Marker α -SMA und CTGF auswirkt.

Zur Messung des basalen cAMP-Spiegels wurden NRCF mit Ad-EGFP (Negativkontrolle) und Ad-PDE2 zur Überexpression von PDE2 für 48 h infiziert (2.2.3.). Anschließend wurden die Fibroblasten lysiert und der cAMP-Spiegel mit einem Enzymimmunotest bestimmt (2.4.6.). Zur Ermittlung des Gehaltes an profibrotischen Markern wurden die lysierten Zellen auf die Expression an α -SMA und CTGF untersucht (2.4.1., 2.4.4.). GAPDH diente als Ladekontrolle für gleichmäßige Beladung des Blots. Wie zu erwarten, zeigte sich bei PDE2-Überexpression ein stark erniedrigter Spiegel des basalen cAMP im Zellgesamtlysat um den Faktor 7 (Abb. 13 A). Außerdem führte die PDE2-Überexpression in den Fibroblasten zu einer vermehrten Differenzierung zu Myofibroblasten, erkenntlich an einer erhöhten Expression der profibrotischen Faktoren α-SMA und CTGF (Abb. 13 B - D). Die Expression an α -SMA war ungefähr um den Faktor 3,5 erhöht, der an CTGF um 2,5.

 α -SMA dient dem Fibroblasten zur Bildung von Stressfasern. Daher wurde ebenfalls überprüft, ob die gefundene Erhöhung des α -SMA-Gehaltes bei den Fibroblasten zu morphologischen Veränderungen führt. Hierzu wurden mit Ad-EGFP und Ad-



ABBILDUNG 13 - CAMP-Konzentration und profibrotische Faktoren. (A) Basale cAMP-Konzentration, gemessen mit einem Enzymimmunotest, n = 5. (B) Repräsentative Immunoblots und (C, D) Quantifizierung der Expression von α -SMA und CTGF, normalisiert auf GAPDH; n = 8 - 12. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p ≤ 0,05 vs. Ad-EGFP bzw. C.



ABBILDUNG 14 - Repräsentative Bilder durch Immunfluoreszenz der α-SMA- und CTGF-Expression. Der Kern wurde mit DAPI gefärbt und die EGFP-Epifluoreszenz zeigt eine positive Virusinfektion.

PDE2 infizierte NRCF mit Paraformaldehyd fixiert und das α -SMA bzw. CTGF durch Immunofluoreszenz sichtbar gemacht (2.4.5.). Der Kern wurde mit DAPI angefärbt.

Wie man auf den Fluoreszenzbildern erkennt (Abb. 14) ist bei den Fibroblasten mit PDE2-Überexpression in der Tat eine vermehrte Ausbildung von Stressfasern zu erkennen. Bei den Fibroblasten mit Immunofluoreszenzfärbung auf CTGF erkennt man zudem eine leichte Erhöhung des Gehaltes an CTGF bei PDE2-Überexpression, welches sich vor allem perinukleär, aber auch zytosolisch findet.

3.1.4. AUSWIRKUNGEN DER PDE2-ÜBEREXPRESSION AUF DIE STEIFHEIT VON KONSTRUIERTEM BINDEGEWEBE (ECT)

Im lebenden Herzen bedeutet ein mehr an Myofibroblasten und deren profibrotischen Faktoren in der Regel auch eine Zunahme an Fibrose und somit an Gewebesteifheit. Um zu prüfen, ob es bei kardialem Gewebe bei einer PDE2-Überexpression generell zu einer Zunahme an Steifheit kommt, wurden Ringe aus künstlichem Bindegewebe mit und ohne PDE2-Überexpression hergestellt. Diese Konstruierten Bindegewebsringe (ECT) stellen ein 3D-Zellkulturmodell von Bindegewebe dar um reproduzierbare Ergebnisse unter steht gleichen Bedingungen zu erhalten. Dazu wurden NRCF mit Ad-PDE2 bzw. Ad-EGFP (Kontrolle) infiziert und daraus ECT-Ringe hergestellt (2.3.1.). Es wurde sich für eine MOI beider Viren von 400 entschieden, da sich bei dieser Viruskonzentration die beste Infektion der Zellen im ECT zeigte (Abb. 15 A). Es wurde darauf geachtet, dass die ECT-Ringe mit Ad-EGFP und Ad-PDE2 eine möglichst ähnliche Infektionsstärke zeigten, indem die GFP-Fluoreszenzstärke verglichen wurde (Abb. 15 B). Einige dieser Ringe wurden außerdem vermessen, hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen PDE2-ECTs und Kontroll-ECTs. Bei den Ringen mit MOI 400 zeigte sich ein Durchmesser (äußerer Rand) von 4.5 ± 0.2 mm, eine Dicke der ECT-Ringe von 0.5 ± 0.1 mm und ein Gewicht von $18 \pm 1,5 \text{ mg} (n = 5)$. Die Ringe wurden in Schritten von 125 µm so lange gedehnt, bis sich ein Reißen der Ringe zeigte (2.3.1.) und die passive Kraft pro Schritt aufgetragen (Abb. 15 D).

Es zeigte sich, dass eine PDE2-Überexpression zu einer erhöhten passiven Kraft und somit Steifheit des ECTs führte. Bei zunehmender Dehnung nimmt dieser Unterschied sogar zu. Dies ist somit ein erster Hinweis, dass die erhöhte Konzentration an profibrotischen Faktoren durch den erniedrigten cAMP-Spiegel bei PDE2-Überexpression zu einer erhöhten Fibrotisierung und somit einer zunehmenden Steifheit des Gewebes führt.

3.1.5. EINFLUSS EINER ZUSÄTZLICHEN BETA-ADRENERGEN STIMULATION

Im Falle einer Herzinsuffizienz kommt es als Folge des Kompensationsprozesses zu einer erhöhten Aktivierung des Sympathikus und somit zu einer erhöhten β-adrenergen Stimulation. Es wurde daher untersucht, wie sich zusätzlich zur PDE2-Überexpression eine Stimulation der β-Adrenozeptoren auf den cAMP-Spiegel und die Konzentration der profibrotischen Faktoren auswirkt. Um zu untersuchen ob und in wie weit die kardiale PDE2 an der Erniedrigung der β-adrenerg ausgelösten cAMP-Synthese beteiligt ist, transduzierten wir NRCF mit einem zytosolisch exprimierten EPAC2-Biosensor auf cAMP und ermittelten die Änderung im cAMP-Gehalt nach Stimulation mit Isoprenalin (ISO) mit Hilfe von FRET (2.5.1.). Isoprenalin ist ein synthetisches Derivat des Neurotransmitters / Hormons Adrenalin und stimuliert β -Adrenozeptoren.

Wie an den Mittelwerten des CFP/YFP-Verhältnisses der FRET-Messung zu sehen, führte die Stimulation mit ISO zu einer cAMP-Akkumulation in den NRCF (Abb. 16 A und B). Diese Erhöhung war um rund 75 % reduziert unter PDE2-Überexpression und konnte auch konsequenterweise nach PDE2-Inhibition mit dem selektiven Inhibitor BAY 60-7550 wieder hergestellt werden. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei Messung des basalen cAMP-Spiegels im Zellgesamtlysat mit einem Enzymimmunotest (2.4.6.; Abb. 16 C).

Als nächstes untersuchten wir den Einfluss einer Stimulation mit ISO auf die Expression der profibrotischen Faktoren α -SMA und CTGF, welche nach PDE2-Überexpression erhöht waren. Hierzu wurden mit Ad-EGFP und Ad-PDE2 infizierte





D



ABBILDUNG 15 - ECTs mit Ad-PDE2. (A) ECTs mit aufsteigender Viruskonzentration, hier beispielhaft Ad-PDE2. (B) Repräsentative ECT-Ringe infiziert mit Ad-EGFP (Kontrolle) und Ad-PDE2 als Kontrolle einer identischen Virusinfektion. (C) Repräsentativer Westernblot der ECTs zur Verdeutlichung der erfolgreichen PDE2-Überexpression. (D) Spannungs-Dehnungs-Diagramm zur Bestimmung der Steifheit (passive Kraft) der ECT-Ringe; n = 5 mit je 4 Wiederholungen. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. Ad-EGFP



ABBILDUNG 16 - Effekt von ISO auf den cAMP-Spiegel und die profibrotischen Faktoren in NRCF. (A) Repräsentativer FRET-Verlauf, normalisiert auf den basalen CFP/YFP-Verlauf nach Stimulation mit 50 nM ISO und 100 nM des spezifischen PDE2-Inhibitors BAY 60-7550. (B) Durchschnitt der Antwort auf 50 nM ISO als Prozent der maximalen Antwort (ISO + BAY), n = 3 - 4. (C) cAMP-Spiegel im Gesamtzellysat nach Stimulation mit ISO für 5 Minuten, gemessen mit EIA, n = 5. (D) Repräsentative Immunoblots und (E) Quantifizierung der α -SMA- und CTGF-Expression nach 24 h Stimulation mit ISO, normalisiert auf α -Tubulin, n = 3 mit 2 - 3 Replikationen. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p ≤ 0,05 vs. Ad-EGFP.

(2.2.3.) NRCF für 24 h mit Isoprenalin stimuliert (2.2.4.), lysiert und auf α -SMA und CTGF geblottet (2.4.4.). Als Ladekontrolle diente hier α -Tubulin, da sich GAPDH bei ISO-behandelten NRCF als ungünstig herausstellte.

Die Kontrollzellen zeigten dabei eine relativ geringe Expression an α -SMA und CTGF, die sich auch durch Gabe von ISO nicht weiter reduzieren ließ (Abb. 16 D und E). Viel wichtiger jedoch, der in den PDE2-transduzierten NRCF erniedrigte cAMP-Pool wirkte der PDE2-ausgelösten Myofibroblastendifferenzierung nicht entgegen.

3.1.6. EINFLUSS EINER ZUSÄTZLICHEN GUANYLATZYKLASE-AKTI-VIERUNG

Überschreitet die intrazelluläre cGMP-Konzentration 500 nM, wird PDE2 nicht nur durch cGMP aktiviert, sondern ist auch an dessen Hydrolyse beteiligt (Zaccolo 2007). Zelluläres cGMP wird entweder durch membrangebundene oder zytosolische Guanylatzyklasen (GC) hergestellt. Daher untersuchten wir die Auswirkung der kardialen PDE2 auf die basale, die ANP/GC-A- und die NO/sGC-induzierte cGMP-Signalamplitude sowie ihre Auswirkung auf die cAMP-Hydrolyseaktivität mit Hilfe eines EIA (2.4.6.). Die NRCF wurden hierfür für 10 Minuten mit 1 µM ANP oder 40 µM SNP stimuliert (2.2.4.). Die basale cGMP-Konzentration wurde nicht durch PDE2 beeinflusst (Abb. 18 A). Sowohl Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) wie auch das Stickstoffmonoxid (NO)-produzierende Natrium-Nitroprussid (SNP) zeigten eine robuste 2 - 3fache Erhöhung an cGMP, mit einer geringfügigen Abnahme der SNP/ PDE2-Antwort, verglichen mit der von SNP/EGFP (2,2fach bzw. 3fach) (Abb. 18 A). Außerdem kam es bei cGMP-Erhöhung durch Stimulation der GC zu einer geringen cAMP-Erhöhung, die bei SNP höher war als bei ANP (Abb. 18 B). Eine PDE2-Überexpression hingegen führte bei cGMP-Erhöhung zu einer Abnahme des cAMP-Spiegels (Abb. 18 B).

Als Nächstes untersuchten wir, wie der erhöhte cGMP-Spiegel und die so resultierenden cAMP-Spiegel den fibrotischen PDE2-Phänotyp beeinflussen. Hierzu stimulierten wir mit Ad-EG-FP und Ad-PDE2 infizierte NRCF mit 1 µM ANP oder 40 μ M SNP und untersuchten die Expression der profibrotischen Faktoren (2.2.4., 2.4.1., 2.4.4.). ANP und SNP führten zu einer Reduktion der basalen Menge an α -SMA, hatte jedoch keinen Einfluss auf die CTGF-Expression in Kontrollzellen (Abb. 18 C und D). Jedoch konnte sowohl ANP und auch SNP die Menge an α -SMA und CTGF in NRCF mit PDE2-Überexpression komplett normalisieren (Abb. 18 C und D).

Die Daten aus 3.1. wurden in *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2014 veröffentlicht (Vettel, Lämmle 2014), siehe "VIII. Anhang".



ABBILDUNG 17 - Schematischer Überblick der gefundenen Ergebnisse in NRCF: cAMP und cGMP wirken der Myofibroblastendifferenzierung entgegen. In NRCF reduziert die kardiale PDE2 vornehmlich den cAMP-Spiegel. Die Abnahme an cAMP wird durch cGMP-erhöhende Stimuli kompensiert.



ABBILDUNG 18 • Effekt von ANP und SNP auf den cGMP-Spiegel und die profibrotischen Faktoren. (A) Globaler cGMP-Spiegel, ermittelt durch EIA basal und nach Stimulation mit 1 μ M ANP oder 40 μ M SNP für 10 Minuten; n = 5 mit 3 Replikationen. (B) Mittelwerte der Antwort auf 100 nM ANP oder 1 mM SNP gemessen mittels FRET und normalisiert auf das CFP/YFP-Verhältnis nach Behandlung mit 150 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und 30 μ M Forskolin (= 100 % Antwort); n = 4 - 6. (C) Repräsentative Immunoblots und (D) Quantifizierung der α -SMA und CTGF-Expression nach 24 h Stimulation mit 1 μ M ANP oder 40 μ M SNP; n = 5. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p ≤ 0,05 vs. Ad-EGFP; #p ≤ 0,05 vs. Ad-EGFP basal; \$p ≤ 0,05 vs. Ad-PDE2 basal.

3.2. Funktion der PDE2 im kardialen Myozyten

3.2.1. PDE2 IM KONSTRUIERTEN HERZMUSKEL

Herzgewebe besteht zum größten Teil aus kardialen Myozyten und Fibroblasten. Die Funktion der PDE2 im kardialen Fibroblasten wurde in 3.1. genauer untersucht.

Unsere Arbeitsgruppe (Mehel 2013) konnten zeigen, dass die myokardiale PDE2 in insuffizienten Herzen vermehrt auftritt. Außerdem ist bekannt, dass die Aktivität der myokardialen PDE2 in β -adrenerg desensibilisierten Herzen höher ist (noch unveröffentlichte Arbeit). Es stellte sich nun die Frage, ob sich die kardiale PDE2-Erhöhung durch chronisch β -adrenerg gestresste Herzen, analog wie im Falle einer Herzinsuffizienz, mit einem standartisierten 3D-Gewebsmodell eines Herzmuskels nachbilden lässt.

Hierfür wurden EHMs aus neonatalem Herzgewebe hergestellt (2.3.2.) und die Hälfte von diesen für 6 Tage mit 100 µM Noradrenalin (NA) stimuliert. Noradrenalin ist ein Katecholamin mit einer stimulierenden Wirkung auf $\alpha_1/_2$ - und β_1 -Adrenozeptoren. Es wurde sich für NA als Stimulanz entschieden, da dies den realen physiologischen Bedingungen, im Gegensatz zu Isoprenalin, am nächsten kommt. Diese EHMs wurden dann in einen Kraftmesser eingehängt, mit 150 mA stimuliert, die Ca2+-Konzentration von 0,2 mM (basal) auf 0,4 mM erhöht und die Änderung der Kontraktionskraft bestimmt. Nach 8 Minuten Inkubation wurden 100 nM ISO und nach weiteren 8 Minuten 1 µM des PDE2-Inhibitors BAY 60-7550 zugesetzt und ebenfalls jeweils die Kontraktionskraftänderung bestimmt (2.3.2.).

Zur Auswertung wurden nur EHMs verwendet, die eine Reaktion auf Ca²⁺ zeigten. Die NA-behandelten EHMs zeigten insgesamt eine geringere Reaktion auf alle Stimuli (Abb. 19). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher alle Werte auf einen Basalwert von 1 normiert. Es zeigte sich so, dass die relative Kraftänderung bei den NA-behandelten EHMs identisch war mit der der Kontrollgruppe, jedoch eine höhere Antwort auf ISO zeigten (Abb 19). Viel wichtiger jedoch, bei den NA-behandelten EHMs konnte eine signifikante Erhöhung um durchschnittlich 7 % nach Behandlung mit dem PDE2-Inhibitor BAY 60-7550 gefunden werden (Abb 19). Dies könnte auf eine höhere Expression an PDE2 in diesen EHMs hindeuten.

3.2.2. PDE2 IM ADULTEN KARDIOMYOZYT

Die adulten Kardiomyozyten wurden aus transgenen Mäusen mit einer rund 10fachen myokardialen PDE2-Überexpression entnommen. Die Generierung der Mäuse ist unter 2.6.1. beschrieben, sie werden in Abschnitt 3.3. genauer charakterisiert. Da schon gezeigt wurde, dass die PDE2 am stärksten in die Regulation des cAMP-Spiegels eingreift, wurde sich auch hier auf die Untersuchung des basalen cAMP-Spiegels unter bestimmten Bedingungen konzentriert. Dies wurde mit Hilfe von FRET-Messungen erreicht. Um die zellulären cAMP-Spiegel zu messen, wurden die heterozygoten PDE2A3-transgenen Tiere mit homozygot transgenen Tieren verpaart, die global einen CFP/ YFP-EPAC2-Biosensor auf cAMP exprimieren. Die Mäuse mit dem EPAC2-Biosensor wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Nikolaev zur Verfügung gestellt (Calebiro 2009). Aus der Verpaarung gingen somit einfach transgene Tiere (nur EPAC2-Biosensor) und zweifach transgene (EPAC-Biosensor und PDE2A3) hervor. Die einfach transgenen Tiere werden zur Vereinfachung im Weiteren als "Wildtyp" (WT) bezeichnet und die doppelt transgenen als "Transgen" (TG). Aus den Herzen wurden die adulten Kardiomyozyten (AMCM) mittels enzymatischer Langendorff-Perfusion isoliert (2.1.2.) und noch am selben Tag für FRET-Messungen verwendet (2.5.1.).

Als Erstes wurden die isolierten AMCM mittels Westernblot auf eine vorhandene PDE2-Überexpression der TG-Tiere hin überprüft, was sich bestätigte (Abb. 20).

Sodann wurde untersucht ob die beta-adrenerge Aktivierung in AMCM gleichermaßen von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren vermittelt wird und ob sich



ABBILDUNG 19 - Vergleich der absoluten und relativen Kontraktionskraft der Kontroll-EHMs zu den NA-behandelten EHMs. **Reaktion** auf 0,4 mM Kalzium (Ca), 100 nM Isoprenalin (ISO) und 1 μ M BAY 60-7550 (BAY); n = 7 (Kontrolle), 11 (NA) aus 3 Wiederholungen. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p ≤ 0,05 vs. basal; #p ≤ 0,05 vs. Ca; \$p ≤ 0,05 vs. ISO.



ABBILDUNG 20 - Blot der adulten Mauskardiomyozyten (AMCM) auf PDE2. Kontrolle der PDE2-Überexpression in den isolierten AMCM.

ein Unterschied zwischen WT und TG erkennen lässt. Hierzu wurden die AMCM entweder mit 100 nM des selektiven Blockers des β_1 -AR CGP 20712 oder mit 50 nM des selektiven β_2 -AR-Blockers ICI 118,551 für einige Minuten inkubiert und anschließend mit 100 nM Isoprenalin (ISO) stimuliert. ISO ist ein unselektiver Aktivator der $\beta_1/_2$ -AR. Um die maximale cAMP-Antwort zu erhalten, wurden die Zellen nach dem ISO noch zusätzlich mit dem PDE-Inhibitor IBMX (150 μ M) und dem AC-Aktivator Forskolin (30 μ M) behandelt. Diese maximale cAMP-Antwort wurde auf 100 % gesetzt und darauf die ISO-Antwort bezogen.

Es zeigte sich bei den PDE2-TG AMCM eine um die Hälfte reduzierte beta-adrenerge cAMP-Antwort, sowohl bei β_1 - als auch bei β_2 -AR (Abb. 21). Dabei ist das Verhältnis zwischen ISO-Konzentration und cAMP-Antwort nicht linear, sondern zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Kumar 2006, Milhaud 2002). Außerdem entscheidend, die Myozyten zeigten eine wesentlich bessere Erregbarkeit durch den β_1 -AR als durch den β_2 -AR, sowohl im WT-Fall als auch bei den transgenen Myozyten (Abb. 21). Bei den WT-AMCM fand sich eine 6fach höhere Stimmulierbarkeit durch den β_1 -AR, verglichen mit β_2 -AR. Bei den TG-AMCM war die Erregbarkeit über den β_1 -AR 4fach höher gegenüber dem β_2 -AR.

PDE2 kann durch eine Erhöhung der cGMP-Konzentration aktiviert werden. Eine Erhöhung der cGMP-Konzentration erreicht man durch GC-Stimulation mit ANP, BNP, NO oder CNP, wobei sich bei CNP der größte Effekt zeigt. Allerdings beeinflusst ein erhöhter cGMP-Spiegel nicht nur die PDE2, sondern auch die PDE3, welche durch cGMP gehemmt wird (vergl. Abb 4).

Um einen genügend hohen cAMP-Grundspiegel zu haben um Änderungen durch die cGMP-kontrollierte Aktivierung der PDE2 zu sehen, wurden die AMCM zuerst mit 30 μ M Forskolin stimuliert. Anschließend wurde die membrangebundene GC durch 100 nM CNP aktiviert und die Änderung im cAMP-Spiegel mit Hilfe von FRET bestimmt. Anschließend wurde zusätzlich die lösliche GC mit 1 mM des NO-produzierenden Natrium-Nitroprussid aktiviert und nach Erreichen eines stabilen Signals mit Gabe von 150 μ M IBMX die maximale cAMP-Antwort erreicht. Diese maximale cAMP-Antwort wurde wieder auf 100 % gesetzt und drauf die anderen cAMP-Werte bezogen.

Wie zu erwarten war, zeigten sich auch hier bei den transgenen AMCM relativ gesehen geringere cAMP-Spiegel als bei den WT-Zellen (Abb. 22).

Bei Erhöhung der cGMP-Konzentration mit CNP fand sich eine Erhöhung der cAMP-Konzentration, die bei den WT-Zellen im Schnitt doppelt so hoch ausfiel wie bei den transgenen AMCM. Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration nach Steigerung der cGMP-Konzentration könnte auf eine PDE3-Beteiligung hindeuten. Bei den transgenen AMCM fand sich zudem noch eine geringe, aber nicht signifikante, Steigerung der cAMP-Konzentration nachdem zusätzlich noch die zytosolische cGMP-Synthese aktiviert wurde. Diese Erhöhung blieb bei den WT-Myozyten völlig aus (Abb. 22). Somit lässt sich hier ein komplexes Zusammenspiel zwischen PDE2-Aktivierung und PDE3-Hemmung vermuten. Außerdem scheint sich die überexprimierte PDE2 weder durch CNP, noch durch SNP weiter aktivieren zu lassen und liegt somit permanent aktiv in der Zelle vor.

3.3. Funktion der myokardialen PDE2 im transgenen Tiermodell der Maus

Nachdem die grundlegende Funktion der PDE2 *ex vivo* in den Zellen des Herzens, kardialen Fibroblast und Kardiomyozyt, untersucht war, wurde die Funktion *in vivo* im transgenen Mausmodell un-









ABBILDUNG 21 - Selektive Aktivierung des β_1/β_2 -AR. (A) Repräsentativer FRET-Verlauf bei selektiver Stimulation des β_1 -AR (β_1 -AR) mit 100 nM ISO nach Behandlung mit 50 nM ICI 118,551 oder des β_2 -AR (β_2 -AR) mit 100 nM CGP 20712. (B) Durchschnitt der Antwort auf 100 nM ISO als Prozent der maximalen Antwort (150 μ M IBMX + 30 μ M Forskolin), n = 12 - 18 (WT), 5 - 8 (TG), 2 (Maus). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT; #p \leq 0,05 vs. β_1 -AR.





ABBILDUNG 22 • Effekt einer cGMP-Stimulation auf den cAMP-Spiegel. Repräsentativer FRET-Verlauf bei Stimulation der cGMP-Produktion mit 100 nM CNP und 1 mM SNP. Und Durchschnitt der Antwort als Prozent der maximalen Antwort (IBMX + Forskolin), n = 13 (WT), 11 (TG), 2 (Maus). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.

tersucht. Hierfür wurde ein Konstrukt zur Expression der PDE2A3-Sequenz unter der Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen Promotors aMHC, wie unter 2.6.1. beschrieben, in das Genom einer Maus eingebracht. Die daraus entstandenen transgenen Tiere wurden über mehrere Generationen auf einen C57BL6/J-Hintergrund zurückgekreuzt. Dieser Mäusehintergrund wird in der kardiovaskulären Forschung häufig verwendet, da er zur Plaquebildung, und somit Arteriosklerose, neigt. Es entstanden so verschiedene PDE2A3-Linien mit unterschiedlicher Expressionsstärke, die alle echokardiographisch charakterisiert wurden. Da alle diese Linien relativ ähnliche phänotypische Eigenschaften zeigten, beschränkt man sich im Weiteren nur auf eine Linie. Diese hatte eine Expressionsstärke die ungefähr in der Mitte aller Linien lag.

3.3.1. EXPRESSIONSSTÄRKE DER PDE2A3-TRANSGENEN LINIE Um den Grad der Überexpression zu bestimmen, wurden einigen WT- und TG-Tieren das Herz entnommen, für Westernblot aufbereitet (2.4.2., 2.4.4.) und die Proben auf PDE2 geblottet. Bei der hier beschriebenen Linie fand sich eine rund 10fach erhöhte PDE2-Expression (Abb. 24).

3.3.2. BASALCHARAKTERISIERUNG DER TRANSGENEN MAUSLINIE Um den erhaltenen Phänotyp durch die PDE2-Überexpression genauer zu bestimmen, wurden die Tiere mit Hilfe von Echokardiographie und Bestimmung der biometrischen Parameter charakterisiert. Mit Hilfe der Echokardiographie wurden die Parameter Herzfrequenz (HR), fraktionelle Flächenänderungsrate des linken Ventrikels (FAS-LV), die Auswurffraktion (EF) und das linksventrikuläre Gewicht (LVM) ermittelt. Es wurde jeweils nur der linke Ventrikel untersucht. Als biometrische Parameter nach Organentnahme (2.7.3.) wurden das Gewicht der Maus, des Herzens und der Lunge und die Länge der Tibia erhoben. Die Tibialänge dient als stabile Referenz, da sie sich, im Gegensatz zum Körpergewicht, nicht durch die Ernährung und andere biotische bzw. abiotische Faktoren beeinflussen lässt. Ein erhöhtes Herzgewicht ist ein Indikator einer möglichen Herzhypertrophie, ein erhöhtes Lungengewicht ein Hinweis auf eine Linksherzinsuffizienz.

Die echokardiographische Untersuchung wurde ohne und mit pharmakologischer Belastung durch Dobutamin (Dobutamin-Stress-Echokardiographie) durchgeführt. Es wurde dafür eine niedrige Dosis von 1 μ g/g KG und eine hohe von 10 μ g/g KG gewählt. Die Stress-Echokardiographie dient der myokardialen Vital- und Ischämiediagnostik (Völler 2000). Die Mäuse hatten ein Alter von 8 - 10 Wochen.

Man erkennt in den Daten der Echokardiographie, dass die PDE2-transgenen Tiere sowohl unter basalen Bedingungen, wie auch unter Dobutamin-Stress eine, rund 10 - 15 %, erniedrigte Herzfrequenz gegenüber den Kontrolltieren aufwiesen (Abb. 23 A). Es fand sich eine Erhöhung der EF unter basalen Bedingungen, was für eine verbesserte Herzfunktion bzw. Hyperkontraktilität der PDE2-transgenen Tiere unter ungestressten Bedingungen spricht. Die FAS, und somit die Funktion des linken Ventrikels, zeigte unter basalen Bedingungen eine leichte, aber signifikante Erhöhung. Dies lies jedoch unter leichtem Dobu-Stress nach und war schließlich bei hohem Dobu-Stress komplett verschwunden (Abb. 23 A). Das, auf das Körpergewicht normierte, Gesamtherzgewicht zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und TG (Abb. 23 B). Es liegt somit keine Hypertrophie der transgenen Herzen vor.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei den anderen erhaltenen PDE2A3-Linien mit anderem Expressionsgrad (Daten nicht gezeigt).

3.3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TRANSGENEN MAUSLINIE

Nach der Basalcharakterisierung mittels der physiologischen und biometrischen Parameter der Mauslinie wurde die Linie molekularbiologisch charakterisiert. Hierzu wurde der bei der Organentnahme entnommene Ventrikel lysiert und mittels Westernblot auf wichtige Proteine der Kopplung zwischen Erregung und Kontraktion (vergl. Abb. 3) unter-





ABBILDUNG 23 - Charakterisierung der transgenen Mauslinie. Basalcharakterisierung durch Echokardiographie (A) der verwendeten Mäuse unter basalen Bedingungen und unter Dobu-Stress, n = 15 - 32, 8 - 10 Wochen alt. (B) Biometrische Parameter der verwendeten Mäuse nach Organentnahme, n = 5, 8 - 10 Wochen alt. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT, *\$ \leq 0,05 vs. basal.

sucht. Es wurden Regulatorproteine der Muskelkontraktion, wie cMyBP-C-Ser282, Phospho-Troponin (TnI-Ser23/24) und Troponin I (TnI), sowie Ca²⁺-regulierende Proteine, wie PLB-Ser16, PLB, SERCA2A, RyR2, RyR2-Ser2814 und RyR2-Ser2808 quantifiziert. Es wurde die Expression bzw. Phosphorylierung der Proteine unter basalen Bedingungen betrachtet.

Hierzu wurde bei 30 Wochen alten Mäusen das Herz entnommen (2.7.3.) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nun wurden die Herzen lysiert und von den Proben Westernblots angefertigt (2.4.2., 2.4.4.). Die Blots wurden von Dr. Christiane Vettel (Abb. 25 A) angefertigt. Der Versuch wurde mit einer zweiten Gruppe Tiere wiederholt. Die Werte aus Abb. 25 B / 26 sind gepoolte Ergebnisse aus beiden Serien.

Bezüglich der Expression von PLB, SERCA2A, RyR2, TnI, RyR2-Ser2814 und RyR2-Ser2808 konnte kein Unterschied zwischen WT und TG gefunden werden (Abb. 25 / 26).

Zur Normalisierung der phosphorylierten Phospholambane, der SERCA2A und des phosphorylierten cMyBP-C wurde sich für CSQ entschieden. Man erkennt eine deutliche Abnahme der PKA-kontrollierten PLB-Phosphorylierung an Ser16 bei den transgenen Tieren. Die Phoshorylierung der kontraktilitätsregulierenden Proteine cMyBP-C bzw. TnI war in den transgenen Tieren ebenfalls signifikant erniedrigt (Abb. 25 A/B und 26). Außerdem erkennt man eine relative gleichmäßige CSQ-Expression in allen Proben (gleichmäßige Beladung). Der PDE2-Blot zeigt die kardiale PDE2-Überexpression der transgenen Tiere an (Abb. 25 A). Ergebnisse



ABBILDUNG 24 - Kardialer PDE2-Expressionslevel der transgenen Mauslinie. (A) Repräsentative Immunoblots und (B) Quantifizierung der PDE2-Expression, n = 4. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.



ABBILDUNG 25 • Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mäuse - A. (A) Repräsentative Immunoblots und (B) Quantifizierung. Alter der Tiere 30 Wochen. n = 7 - 8. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.



ABBILDUNG 26 - Molekularbiologische Charakterisierung der transgenen Mäuse - B. Quantifizierung aus Abb. 25 A. n = 7 - 8, Alter der Tiere 30 Wochen. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.

3.3.4. ZEITLICHE ÄNDERUNG DER BASALEN WERTE, ALTERUNGS-STUDIE

An einer Herzinsuffizienz kann man in jedem Alter erkranken, jedoch nimmt die Häufigkeit an Neuerkrankungen (Inzidenz) und die Krankheitshäufigkeit (Prävalenz) in höherem Alter zu. Es wurde daher auch untersucht, ob und wie sich die durch Echokardiographie ermittelten basalen Werte bei zunehmendem Alter verändern. Hierzu wurden WT- und transgene Mäuse über ihren gesamten Lebenszyklus hinweg alle 3 Monate (12 Wochen) echokardiographisch untersucht. Ab einem Alter von 9 Monaten wurde zusätzlich eine Stress-Echokardiographie mit 10 µg/g KG Dobutamin durchgeführt. Da in hohem Alter durch die zunehmende Sterblichkeit zu wenig Tiere vorhanden waren um einen guten Mittelwert zu bilden, ist in Abb. 27 der Verlauf nur bis zum Alter der Tiere von 24 Monaten abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die schon in der Basalcharakterisierung gefundene erniedrigte Herzfrequenz der transgenen Tiere auch über die Dauer von 2 Jahren relativ stabil erhalten blieb. Dies fand sich sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Dobutaminstress. Die erhöhte fraktionelle Flächenänderungsrate des linken Ventrikels (FAS-LV) der transgenen Tiere blieb unter basalen



ABBILDUNG 27 - Graphische Darstellung der Werte des Alterungsexperiments. Verlauf der Basalwerte der verwendeten Mäuse über einen Zeitraum von zwei Jahren und Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Überlebens. n = 3 - 7 (WT), 7 - 8 (TG). Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.

Bedingungen bis ins hohe Alter hin ebenfalls stabil, glich sich dann aber den WT-Tieren an. Unter Dobutaminstress konnte über die betrachtete Zeit kein Unterschied zwischen TG- und WT-Tieren gefunden werden.

Ähnliches fand sich bei der Auswurffraktion (EF). Auch hier war die (hyperkontraktil) erhöhte EF unter basalen Bedingungen bis ins hohe Alter stabil, um sich dann den WT-Tieren anzugleichen. Außerdem besaßen die transgenen Tiere ein erhöhtes Schlagvolumen, das bis ins hohe Alter stabil blieb und sich dann den Werten der WT-Tiere anglich. Das Angleichen der Werte der TG-Tiere in höherem Alter an die Werte der WT-Tiere könnte in Zusam-

menhang mit der Abnahme der Zahl an WT-Tieren durch Tot in höherem Alter stehen.

Jedes verstorbene Tier wurde in einen Kaplan-Meier-Blot eingetragen. Begonnen wurde mit 7 WTund 8 TG-Tieren. Einige Tiere mussten aufgrund der festgelegten Abbruchkriterien (2.7.4.) euthanasiert werden. Im Überlebens-Blot in Abb. 27 sind daher nur Tiere aufgeführt, die aufgrund von Altersschwäche entschlafen sind. Man erkennt eine tendenziell leicht höhere Sterblichkeit der WT-Tiere. Das selbe Bild ergibt sich, trägt man alle toten Tiere in den Überlebens-Blot ein (nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Anzahl von 2 WT-Tieren zu keinem transgenen Tier, kann hier kein Signifikanz-Test angewendet werden. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied des auf das Körpergewicht normierten linksventrikulären Gewichts.

3.3.5. TRANSVERSALE AORTENKONSTRIKTION

Wie die vorherigen Ergebnisse nahelegen, zeigen die transgenen Herzen keine signifikante Hypertrophie. Es wurde daher untersucht, wie sich eine Erhöhung der Hypertrophie bei den transgenen Tieren auf den zeitlichen Verlauf der Herzfunktion auswirkt und ob sich Unterschiede zu einer Kontrollgruppe bezüglich der Entstehung einer Herzinsuffizienz zeigen. Hierzu wurde sich des Modells der Transversalen Aortenkonstriktion (TAC) bedient (2.7.2.). Dazu wurde bei 10 - 11 Wochen alten WT- und transgenen Mäusen der Querschnitt der Aorta am Aortenbogen verkleinert, um eine druckinduzierte Hypertrophie zu induzieren. Kurz nach der TAC-Operation wurde bei den Tieren der Stenosegrad mittels Doppler-Echokardiographie bestimmt (2.7.1.). Es wurden nur Tiere mit einer Stenose im Bereich 50 - 100 mmHg für die Auswertung verwendet. Von allen Tieren wurde nach der TAC wöchentlich über einen Zeitraum von 12 Wochen eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt (2.7.1.). Anschließend wurden die Herzen entnommen und die biometrischen Parameter bestimmt (2.7.3.).

Man erkennt eine recht ähnliche Verteilung der Stenosegradienten zwischen WT- und transgenen Tieren (Abb. 28). Bei der Herzfrequenz konnte nach TAC sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den TG-Tieren eine Erhöhung der Herzfrequenz beobachtet werden (Abb. 29). Diese Erhöhung stabilisierte sich ungefähr 7 Wochen nach TAC. Auch hier konnte die schon beobachtete erniedrigte Herzfrequenz der transgenen Tiere gefunden werden, die sich simultan mit den Veränderungen bei den Kontrolltieren verhielt. Somit kann die erniedrigte Herzfrequenz als sehr robuster Phänotyp der myokardial PDE2-transgenen Tiere betrachtet werden. Die erhöhte fraktionelle Flächenänderungsrate des linken Ventrikels (FAS-LV) sank nach TAC sowohl bei den WT- als auch bei den transgenen Tieren bis etwa 10 Wochen nach TAC ab um dann relativ konstant zu bleiben (Abb. 29). Die FAS der TG-Tiere zeigte im TAC-Experiment keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Werten (keine Hyperkontraktilität) (Abb. 29). Ähnliches war im Verlauf der EF zu sehen. Wie zu erwarten, stieg das Herzgewicht der Tiere nach TAC an, um 5 Wochen nach TAC einen relativ stabilen Wert zu erreichen (Abb. 29). Da die TAC-Operation einen Einfluss auf das Gewicht der Tiere hatte, wurde hier das Gewicht des linken Ventrikels auf die Länge der Tibia normiert (LVW/ Tibia). Die Tibialänge wurde bei Organentnahme (12 Wochen nach TAC) ermittelt und ändert sich in diesem Alter der Mäuse nur noch gering (Somerville 2004). Die LVW/Tibia der transgenen Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied zur WT-Kontrolle (Abb. 29). Ein zusätzlicher guter Wert um eine Hypertrophie zu erkennen ist die diastolische posteriore Wanddicke (PWthd), die sich bei einer Hypertrophie deutlich erhöht (Liao 2002). Auch dieser Wert stieg zu beginn, wie LVW/Tibia an (Abb. 29). Hier zeigte sich ab Woche 7 eine stärker ausgeprägte Hypertrophie der WT-Tiere, als bei den TG-Tieren. Die transgenen Tiere zeigten, im Gegensatz zur Alterungsstudie (3.3.4.), eine geringfügig höhere Sterblichkeit als die WT-Gruppe. Allerdings kann auch hier aufgrund der geringen Anzahl von einem WT-Tier keine Signifikanz ermittelt werden. Vergleicht man die Daten der Mäuse 12 Wochen nach TAC mit einer gleichaltrigen Kontrollgruppe ohne TAC (C) sieht man auch hier, dass die Herzfrequenz bei den transgenen Tieren sowohl im Kontrollfall, wie auch bei den TAC-Tieren signifikant erniedrigt ist (Abb. 30 A). Die EF und die FAS war bei den transgenen Tieren signifikant abgesunken, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne TAC (Abb. 30 A). Interessanterweise lag das Herzminutenvolumen (CO) jedoch, ganz egal ob die Tiere transgen sind oder nicht, bzw. ob sie eine TAC-OP hatten oder nicht, stets, um einen Wert von ungefähr 20 ml/min (Abb. 30 A). Die Herz- und Lungengewichte der Tiere nach TAC waren im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe ohne TAC deutlich erhöht (Abb. 30 B). Dies lässt auf eine Hypertrophie und eine Linksherzinsuffizienz der TAC-Tiere schließen. Jedoch zeigte sich bei den WT-Tieren ein leichter Trend einer höhere Zunahme des Herzgewichtes durch TAC als bei den transgenen Tieren. Zusammen mit den signifikanten Daten der PWthd könnte dies auf einen Hypertrophieschutz bei druckinduzierter Hypertrophie der myokardialen PDE2 hindeuten.



ABBILDUNG 28 - Stenosegradienten der TAC-Tiere. Tiere mit einem Gradienten von < 50 mmHg wurden ausgeschlossen.



ABBILDUNG 29 - Graphische Darstellung des TAC-Experiments. Verlauf der Basalwerte der Tiere nach TAC-OP und Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Überlebens. Mäuse zu Beginn 10 - 11 Wochen alt. n = 5 (WT), 6 (TG). Werte sind Mittelwerte \pm SEM; *p \leq 0,05 vs. WT.





ABBILDUNG 30 - Vergleich zwischen Tieren mit und ohne TAC-OP. (A) Vergleich der Basalwerte der Tiere 12 Wochen nach TAC mit gleichaltrigen Tieren ohne TAC. (B) Vergleich der Herz- und Lungengewichte von Tieren mit und ohne TAC bei Organentnahme. Alter der Tiere 22 - 23 Wochen. n = 5 (WT), 6 (TG). Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p \leq 0,05 vs. WT, #p \leq 0,05 vs. C.

IV. DISKUSSION

4.1. Funktion der PDE2 im kardialen Fibroblast

In 3.1. konnte gezeigt werden, dass eine PDE2-Überexpression in kardialen Fibroblasten zwei Konsequenzen mit sich führt. Zum ersten führt PDE2 zu einer zu erwartenden cAMP-Abnahme und zweitens zu einer Induktion von α-SMA und CTGF, auch in Abwesenheit von profibrotischen Faktoren. Es ist bekannt, dass sich Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren, wenn sie in Standard 2D-Kultur sehr dünn ausgesät oder durch autokrine TGF-β-Stimulation aktiviert werden (Masur 1996, Rohr 2011). Um daher möglichst nahe am physiologischen Phänotyp zu bleiben, wurden nur Kardiofibroblasten der Passage 1 verwendet, in denen sich meistens nur eine geringe α -SMA- und CTGF-Expression findet (Abb. 13 B). Die hier gefundenen Daten legen nahe, dass unter Konditionen einer ausgewogenen pround antifibrotischen zellulären Situation, die basale cAMP-Synthese essentiell ist, um eine völlige Fibroblastendifferenzierung zu unterbinden. Da diese Ergebnisse in einer 2D-Kultur gewonnen wurde, kam die Frage auf, ob diese MyoCF-Induktion auch in einer sehr komplexen, Gewebe-ähnlichen Struktur zum Tragen kommt und möglicherweise dessen mechanische Eigenschaften beeinflusst. Es wurde beschrieben, dass eine Kultivierung von Kardiofibroblasten in 3D-Kultur zu einer Erniedrigung der Expression an α-SMA führt (Vozenin 1997, Rohr 2011). Abgesehen davon führt eine PDE2-Expression in der Tat zu einer erhöhten Steifheit ("passive Kraft", basierend auf Matrixumbau), der dreidimensionalen ECTs unter Stress-Dehnungs-Tests. Diese Messung ist natürlich kein Indikator einer akuten kontraktilen Antwort ("aktive Kraft", aufgrund von MyoCF-Kontraktion), welche hier nicht ermittelt wurde. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für eine wichtige Rolle des durch die kardiale PDE2 regulierten cAMP-Pools durch Blockierung von Signalwegen, welche unabhängig durch Zelloberflächeninteraktion aktiviert werden

und erlaubt einen guten Eindruck wie diese molekularen Änderungen direkt auf die Gewebecharakteristik einwirken können. Wie kürzlich von Lu et al. berichtet, sind durch TGF-\beta-transformierte MyoCF aufgrund einer verminderten Expression der Adenylatzyklase (AC) und einer Hochregulation von Phosphodiesterasen weniger empfänglich auf cAMP-erzeugte Stimuli. Die TGF-β-induzierte Transformation war reversibel durch eine pharmakologische Erhöhung der AC-Aktivität und somit dem cAMP-Spiegel (Lu 2013). Die FRET-Experimente zeigten eine signifikante Reduzierung (aber nicht Auslöschung) der Antwort auf β-AR-stimulierte cAMP-Synthese in PDE2-Zellen. Die Frage, die in diesem Kontext darstellt wurde, war, ob diese zusätzliche Verfügbarkeit von cAMP durch endogene Stimuli ausreichend ist um die PDE2-induzierte Verstärkung der Kardiofibroblastendifferenzierung umzukehren. Jedoch war die β-AR-Aktivierung weder in der Lage, den Mangel an basalem cAMP in PDE2-CF zu kompensieren, noch zeigte sie einen signifikanten Effekt auf die Menge an α-SMA und CTGF in Kontrollzellen. Diese Ergebnisse korrespondieren gut mit der Tatsache, dass Arzneistoffe aus der Substanzgruppe der Betablocker wie Carvedilol oder Propranolol, welche verwendet werden um Patienten mit Herzinsuffizienz zu behandeln. das fibrotische Remodeling nicht weiter erhöhen. Ähnlich wie cAMP zeigte das Signalmolekül cGMP, dessen Synthese durch ANP oder NO iniziiert wird, eine inhibierende Wirkung auf die Expression von α-SMA und CTGF in Lungen-, Nieren- oder Kardiofibroblasten (Dunkern 2007, Kapson 2004, Kato 2012).

PDE2 ist eine Dual-Substrat-PDE welche cAMP und cGMP hydrolysiert und durch letzteres aktiviert wird. Daher war die anfängliche Erwartung eigentlich eine Erhöhung des MyoCF-Phänotyps aufgrund einer Erhöhung der PDE2-Aktivität und weiter reduzierte cAMP-Spiegel (Abb. 18 B). Interessanterweise war aber das Gegenteil der Fall. ANP/ SNP-Stimulation führten zu einer Inhibierung der α -SMA- und CTGF-Expression in PDE2-CF, welche trotz erniedrigter cAMP-Spiegel ähnlich zu ANP/SNP-behandelten EGFP-CF war (Abb. 18 C,
D). Daher legen die Daten nahe, dass eine exogene Aktivierung von cGMP-Signalwegen fähig ist, den PDE2-gesteuerten cAMP-Abbau zu umgehen und die nachfolgende Induktion von α -SMA und CTGF umkehrt (Abb. 18 D).

Diese Ergebnisse betonen die kritische Rolle von basalem cAMP in der Abwesenheit von cGMP-erhöhenden Stimuli. Im Kontext von Herzerkrankungen zeigen unsere Daten, dass eine PDE-abhängige cAMP-Erniedrigung kompensiert werden kann durch erhöhte cGMP-Level. Dies stellt potentiell eine therapeutische Option in der Behandlung von Herzinsuffizienz dar. Die Rolle von cAMP und cGMP als anti-fibrotische Mediatoren könnte als schützender Mechanismus bei Herzinsuffizienz wirken.

4.2. Funktion der kardialen PDE2 im Myozyten und im Modellorganismus Maus

4.2.1. KONSTRUIERTER HERZMUSKEL (EHM)

Es ist bekannt, dass die myokardiale PDE2-Expression in insuffizienten menschlichen Herzen gesteigert ist (Mehel 2013) und dass dies auch bei chronisch mit Isoprenalin gestressten Herzen der Maus gefunden werden kann (unpublizierte Daten). Bei Herzinsuffizienz findet sich eine erhöhte beta-adrenerge Aktivität aufgrund einer gesteigerten Erregung des Herzens mit Noradrenalin (NA). Es wurde daher überprüft, ob auch unter diesen, im Vergleich zur 2D-Zellkultur physiologischeren Bedingungen, im ex vivo Experiment eine Erhöhung der PDE2-Expression gefunden werden kann. Hierzu wurde das standardisierte und somit gut vergleichbare System der 3D-Zellkultur mittels EHMs gewählt. Zur Herstellung der EHMs wurden neonatale Rattenzellen verwendet. Diese EHMs wurden über 6 Tage mit NA chronisch stimuliert und dann die Kontraktion gemessen. Trotz standartisierter Herstellung reagieren EHMs nicht alle absolut identisch. Es wurde daher zuerst die basale Kontraktion bei 0,2 mM Ca2+ bestimmt und dann die Reaktion auf eine Ca2+-Erhöhung auf 0,4 mM Ca²⁺ untersucht. Eine Erhöhung der intrazellularen Ca2+-Konzentration führt beim Kardiomyozyten zu einer positiv inotropen und chronotropen Antwort. Jedoch gab es einige EHMs, die keinerlei Reaktion auf die Ca²⁺-Erhöhung zeigten; bei den PDE2-EHMs ungefähr so viele wie bei den Kontroll-EHMs. Diese wurden als nicht funktionsfähig betrachtet und aus der Auswertung ausgenommen. Somit konnte in der relativen (auf den Grundwert normierten) Darstellung eine identische Erhöhung der Kontraktion bei den unbehandelten, verglichen mit NA-behandelten EHMs, gefunden werden (Abb. 19). Betrachtet man jedoch die unnormierten Absolutwerte zeigten die NA-behandelten EHMs allesamt eine geringere Reaktion auf alle Stimuli als die Kontroll-EHMs.

In Hundeherzen wurde bei chronischer NA-Stimulation eine Hypertrophie und Abnahme der Myozyten-Dichte (Apoptose) gefunden (Patel 1991). In einem EHM würde eine Abnahme der Anzahl an Myozyten und deren Vergrößerung zu einer Abnahme der Kraft führen, was die Beobachtungen der NA-behandelten EHMs erklären würde.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die NA-behandelten EHMs eine relativ höhere Stimulierbarkeit durch Isoprenalin. Patel et al. schlossen aus Ihren Daten an Hundeherzen, dass es bei chronisch mit NA-behandelten Herzen zu einer Abnahme der Kopplung zwischen beta-adrenerger Erregung und resultierender Kontraktion kommt. Dies steht im Gegensatz zu den in EHMs gefundenen Daten. Allerdings bestehen physiologische Unterschiede zwischen den adulten Kardiomyozyten im Hundeherzen und den neonatalen CM die für das EHM verwendet wurden. So konnten Kuznetsov et al. einen klaren Unterschied in der Kopplung zwischen beta-adrenerger Erregung und Kontraktion bei neonatalen bzw. adulten Kardiomyozyten finden (Kuznetsov 1995).

Die NA-behandelten EHMs zeigten zudem eine höhere (und signifikante) Zunahme der Kontraktilität, nachdem die PDE2 durch BAY blockiert wurde. Dies lässt auf eine höhere PDE2-Expression in den chronisch NA-gestressten EHMs schließen und steht somit im Einklang mit der Erhöhung der PDE2-Expression in insuffizienten Menschenherzen und chronisch ISO-stimulierten Mäuseherzen. Zur Untersuchung der PDE2 ex vivo in isolierten Kardiomyozyten und in vivo an der lebenden Maus wurde eine Mauslinie generiert, die PDE2A3 über einen aMHC-Promotor spezifisch in Kardiomyozyten exprimiert. Die Foundertiere waren reingeschlechtliche FVB/N-Tiere, da dies die Standardlinie für Pronukleusinjektion darstellt. Diese Tiere wurden zuerst auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Das Resultat waren Tiere mit zwei verschiedenen Fellfarben, schwarz und graubraun. Dies änderte sich auch über die verschiedenen Generationen (F1 - F6) nicht. Für die Versuche wurden Tiere der Generation F2 und F5 verwendet. Es zeigte sich bei Vorversuchen schon ein relativ stabiler Phänotyp mit geringen Schwankungen in der Generation F2 innerhalb der Tiere.

Da das Gen bei einer Pronukleusinjektion zufallsbedingt oft als Concatemer integriert, und somit je nach Injektion eine unterschiedliche Anzahl von Kopien inserieren können, zeigten alle unsere Founder ein unterschiedlich hohes Maß der PDE2-Überexpression. Von allen Linien wurde das Maß der Überexpression mit Hilfe von Westernblot aus Gesamtherzlysat bestimmt. Außerdem wurden alle Linien echokardiographisch und biometrisch charakterisiert. Dabei zeigten alle Linien, unabhängig vom Maß der myokardialen PDE2-Überexpression eine recht ähnliche phänotypische Charakteristik. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden alle mit einer Linie erzielt, die bezüglich dem Maß der myokardialen PDE2-Überexpression ungefähr in der Mitte aller Linien lag. Die Schwierigkeit in der Bestimmung des Überexpressionsgrades lag zuerst an der Wahl des richtigen PDE2-Antikörpers. Mit manchen waren die Werte unrealistisch hoch (SantaCruz) und mit wieder anderen die Banden der Kontrolltiere zu schwach für eine korrekte Auswertung (FabGennix). Schließlich ergab sich (FabGennix) ein Überexpressionsgrad der hier verwendeten Mauslinie einer ca. 10fachen Überexpression (Abb. 24).

4.2.2. ISOLIERTER ADULTER KARDIOMYOZYT

Für die FRET-Versuche wurden PDE2A3-transgene Weibchen (C57BL/6) mit einem FVB/N-Männchen verpaart, welches den FRET-Sensor unter der Kontrolle eines β -Aktin-Primers in allen Zellen zytosolisch exprimiert. Das Resultat waren einfach- und doppelt-transgene Tiere mit Genotyp-unabhängiger weißer oder graubrauner Fellfarbe.

Bei Experimenten mit selektiver β -adrenerger Stimulation zeigte sich, dass AMCMs fast ausschließlich über den β_1 -AR adrenerg stimuliert werden (Abb. 21). Dies gilt sowohl für die WT-AMCM wie auch für die transgenen AMCM. Devic *et al.* konnten an Untersuchungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigen, dass auch hier der β_1 -AR für die Hauptmenge des produzierten cAMP bei β -adrenerger Stimulation verantwortlich ist. Außerdem scheint zwar der β_1 -AR die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration über einen PKA-abhängigen Mechanismus zu erhöhen, hingegen werden bei β_2 -AR-Stimulation Ionenkanäle direkt über einen G-Protein-Mechanismus aktiviert (Devic 2001). Die transgenen Zellen zeigen einen wesentlich ge-

ringeren cAMP-Anstieg nach β_1 - oder β_2 -adrenerger Stimulation (Abb. 21). Dies zeigt, dass die PDE2 in den AMCM nicht nur überexprimiert wird (Abb. 20), sondern auch funktionsfähig ist.

Bei einem vorangegangenen Versuch der Aktivierung der myokardialen PDE2 mittels cGMP, bei einer Vorstimulation mit ISO, waren die Effekte zu gering. Weswegen, für eine stärkere Vorstimulation, Forskolin verwendet wurde. Eine cGMP-Erhöhung mittels CNP führte bei den WT-AMCM zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels (Abb. 22). Dies ist gut vereinbar mit einer Inhibition der PDE3 durch cGMP-Bindung. Bei den PDE2-AMCM ist somit eine Konkurrenz zwischen Aktivierung der myokardial überexprimierten PDE2 und Inhibierung der basalen PDE3 zu rechnen. Hier konnte in der Tat eine Erhöhung der cAMP-Konzentration gefunden werden, die geringer ausfiel, als bei den WT-Zellen. Allerdings konnte das mehr an cAMP durch die PDE3-Inhibition durch die myokardiale PDE2-Überexpression nicht komplett kompensiert

werden. Dies wäre auch nur dann erwartbar, wenn cGMP die PDE3 im selben Maße hemmt, wie sie PDE2 aktiviert. Jedoch ist cGMP wesentlich aktiver im Hemmen der PDE3 als im Aktivieren der PDE2. *In vitro* wurde für cGMP bei PDE2/3 aus HUVECs ein IC_{50} von 59 nM für PDE3-Inhibition und ein EC_{50} von 1 μ M für PDE2-Aktivierung gefunden (Surapisitchat 2007). Somit wäre eine wesentlich höhere PDE2-Überexpression nötig um die Zunahme an cAMP durch die PDE3-Hemmung zu kompensieren.

Interessanterweise konnte bei zusätzlicher cGMP-Erhöhung im Zytosol durch SNP bei den PDE2-transgenen AMCM eine weitere cAMP-Steigerung (und somit PDE3-Inhibition) gefunden werden, die bei den WT-AMCM ausblieb (Abb. 23). Es ist zu vermuten, dass hier die Aktivierung unterschiedlicher cGMP-Pools eine Rolle spielt. CNP bindet an den Rezeptor NPR-B und aktiviert über diesen die membranständige Guanylatzyklase GC-A, was zu einer Erhöhung von cGMP im membranösen Pool führt. SNP hingegen aktiviert über sein Reaktionsprodukt NO die lösliche Guanylatzyklase sGC und führt somit zu einer cGMP-Erhöhung im zytosolischen Pool. Die überexprimierte PDE2A3 ist an Membranen (Plasmamembran und intrazelluläre Membran) gebunden und wird somit hauptsächlich aktiviert, wenn die cGMP-Konzentration im membranösen Pool ansteigt. PDE3 kommt im CM sowohl ebenfalls membrangebunden (Hauptmenge), als auch zytosolisch vor (Bender 2006). Wird also nun die cGMP-Konzentration im Zytoplasma erhöht, so könnte man sich vorstellen, dass nun (auch auf Grund der schon angesprochenen besseren Hemmung der PDE3 durch cGMP als Aktivierung der PDE2) zu einem fast ausschließlichen PDE3-Effekt kommt, was den cAMP-Spiegel weiter ansteigen lässt.

4.2.3. PDE2A3-TRANSGENE MAUS

Bei der Basalcharakterisierung der PDE2-transgenen Mäuse fiel zuerst die erniedrigte Herzfrequenz der PDE2A3-Mauslinie auf (Abb. 23 A). Die Herzfrequenz wird zum einen bestimmt durch HCN-Kanäle (HCN2 und HCN4) im Sinusknoten, welche den zeitabhängigen Einwärtsstrom (I, "funny current") regulieren (Abb. 3). An die HCN-Kanäle kann cAMP binden, was dazu führt, dass die HCN-Kanäle bereits bei einem mehr depolarisierten Membranpotential aktivieren und somit die Impulsfrequenz im Sinusknoten erhöht wird (Larsson 2010). Außerdem führt eine PKA-regulierte Ca2+-Erhöhung im Sinusknoten zu einer erhöhten Impulsfrequenz des Aktionspotentials, welche ebenfalls durch PDE2-Inhibition mit IBMX erhöht werden konnte (Liu 2011). Somit gibt es klare Zusammenhänge zwischen einer erhöhten zellulären cAMP-Konzentration im Sinusknoten und einer erhöhten Herzfrequenz. Der hier gefundene erniedrigte zelluläre cAMP-Spiegel bei myokardialer PDE2-Überexpression könnte somit vice versa für die reduzierte Herzfrequenz in den transgenen Tieren verantwortlich sein.

Abhängig von der Herzfrequenz ist direkt das Herzminutenvolumen nach CO = HR * SV. Somit könnte man annehmen, dass es in den transgenen Tieren zu einem erniedrigten Herzminutenvolumen kommt, was jedoch nicht der Fall war. Die transgenen Tiere zeigten maximal ein leicht erniedrigtes Herzminutenvolumen verglichen mit den WT-Vergleichstieren (vergl. Abb. 31). Allerdings konnte ein signifikant höheres Schlagvolumen der transgenen Tiere gefunden werden (vergl. Abb 27) sowie eine höhere Auswurffraktion (Abb. 23 A). Es kann somit von einer Hyperkontraktilität gesprochen werden.

Alle echokardiographischen Daten wurden unter Narkose mit Isofluran erhoben. Es ist bekannt, dass Isofluran einen senkenden Effekt auf den arteriellen Blutdruck hat und somit, über eine Minderung der Aktivität des Barorezeptorreflexes, die Herzfrequenz senkt (Loushin 2007). Die erniedrigte Herzfrequenz der transgenen Tiere bestätigte sich allerdings auch bei einer Langzeitmessung mittels EKG-Telemetrie. Hierzu wurden den Tieren EKG-Telemetrie-Sender intraperitoneal implantiert und die Herzfrequenz und Aktivität der Tiere in basalem Zustand (und ohne Isofluran) über eine Zeit von 24 Stunden aufgezeichnet. Es konnte auch hier eine stabile erniedrigte Herzfrequenz über den gesamten Zeitverlauf bei den transgenen Tieren gefunden werden (unveröffentlichte Daten von *Vettel et al.*).

Auf die Kontraktilität und das Herzminutenvolumen hat eine Isofluran-Narkose einen verschwindend geringen Effekt (Loushin 2007).

Bei den Tieren fand sich im basalen Zustand keine signifikante Erhöhung des gesamten Herzgewichtes (Abb. 23 B). Somit kann von keiner signifikanten basalen Hypertrophie bei myokardialer PDE2-Überexpression ausgegangen werden.

Die erhöhte Kontraktilität des transgenen Herzens, könnte eine Folge einer kompensatorischen Aktivierung des Sympathikus sein. Dies würde eine Zunahme an Katecholaminen bedeuten und damit eine erhöhte Erregung von β_1/β_2 -AR. Da die β,-adrenere Wirkung jedoch an cAMP gekoppelt ist, welches nachweislich in den transgenen Tieren reduziert ist, könnte es sich dann nur um eine β,-AR-Wirkung handeln, welche auch unabhängig von cAMP zu einer Kontraktilitätssteigerung führt (vergl. Devic 2001). Es könnte mit der Zeit dann allerdings auch zu einer β -Desensitisierung kommen. Ein weiterer Grund der zu einer Hyperkontraktilität führen kann, ist eine Veränderung der Konzentration bzw. des Phosphorylierungsgrades an Proteinen, die an der Kontraktion beteiligt sind.

Es wurden daher Mäuseherzen transgener und von WT-Tieren lysiert und auf Proteine hin untersucht, die maßgeblich an der Kontraktilität und dem Kalziumhaushalt beteiligt sind. Dafür wurden die Herzen der Tieren unter basalen Bedingungen verwendet. Bezüglich der Expression bzw. Phosphorylierung von SERCA2A, PLB, TnI, RyR2, RyR2-Ser2814 und RyR2-Ser2808 konnte kein Unterschied zwischen WT und TG gefunden werden (Abb. 25 / 26). Es fand sich im basalen Zustand eine signifikante

Erniedrigung der PLB-Phosphorylierung an der PKA-Phosphorylierungsstelle Serin-16 (Abb. 25 / 26). Eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung würde eine geringere Aktivität der SERCA2A bedeuten, da diese durch unphosphoryliertes PLB gehemmt wird. Allerdings besitzt das PLB noch eine CaM-KII-Phosphorylierungsstelle an Thr17. Die verminderte Phosphorylierung an Ser16 deutet aber auf eine weniger aktive PKA, aufgrund des geringeren cAMP-Spiegels, in den transgenen Tieren hin (ver-

gl. Abb. 3). Die Phosphorylierung der kontraktilitätsregulierenden Proteine, cMyBP-C und Troponin I, war ebenfalls reduziert (Abb. 25 / 26). TnI ist die inhibitorische Einheit des Troponins und sorgt für eine Inhibition der Kontraktion, bis Kalzium an die Kalzium-bindende Einheit des Troponins (TnC) bindet. Eine TnI-Phosphorylierung führt zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft und einer schnelleren Relaxation (Layland 2005). Eine Erniedrigung, wie bei den transgenen Tieren, könnte somit theoretisch zu einer Erniedrigung der Kontraktionskraft und einer langsameren Relaxation führen. Eine erniedrigte Phosphorylierung von cMyBP-C an Ser282 führt zu einer herabgesetzten Actomyosin-Querverbrückung und kann bei Herzinsuffizienz gefunden werden (James 2011, El-Armouche 2007).

Somit könnten die Veränderungen der Phosphorylierung an cMyBP-C, PLB und TnI theoretisch zu einer herabgesetzten Relaxation und Erniedrigung der Kontraktionskraft beitragen. Allerdings spielen hier noch viele andere Faktoren eine Rolle. Es konnte auch keine verminderte Kontraktionskraft der transgenen Tiere gefunden werden, sondern eine Erhöhung der EF und des FAS. Was darauf schließen lässt, dass die gefundenen Veränderungen der Proteinphosphorylierung nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Bei Betrachtung der Mäuse über einen Zeitraum von zwei Jahren (Alterungsstudie) konnte eine Konstanz der erniedrigten Herzfrequenz über die Zeit gefunden werden (Abb. 27). Es kommt somit zu keinen funktionellen Umbauten, die zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen würden. Hingegen kam es zu einer Abnahme der Kontraktilität der transgenen Tiere in höherem Alter und somit zu einer Angleichung an die Werte der WT-Tiere. Interessanterweise blieb das Herzminutenvolumen allerdings über die Zeit relativ stabil und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und TG (nicht gezeigt). Außer von der Herzfrequenz hängt das Herzminutenvolumen vom Schlagvolumen ab, welches bei den transgenen Tieren ebenfalls erhöht war und sich dann im Alter den Werten der WT-Tiere angleicht (Abb. 27).

Das linksventrikuläre Gewicht blieb bis Monat 12 relativ stabil, um dann etwas anzusteigen (Abb. 27). Somit ist ab einem Alter von einem Jahr eine leichte Zunahme an Hypertrophie erkennbar. Die Sterblichkeit der WT-Tiere setzte früher ein und war auch tendenziell höher als bei den transgenen Tieren. Um daraus Rückschlüsse ziehen zu können ist allerdings die Anzahl der Tiere zu gering. Einige WT-Tiere mussten auch aus Gründen des TierSchG (schwere Bisswunden, Tumore etc.) dem Versuch entnommen werden. Diese Probleme traten bei den transgenen Tieren nicht auf. Daher nahm auch die Zahl der WT-Tiere gegen Ende des Versuchs ab. Aus diesem Grund sind in Abb. 27 nur die Werte bis Monat 24 aufgetragen, da die Zahl von 2 WT-Tieren ab Monat 27 nicht mehr für eine aussagekräftige Mittelwertbildung ausreichend war.

Da die transgenen Tiere mit einer erniedrigten Herzfrequenz gut leben konnten und sogar länger zu leben scheinen, stellt sich die Frage nach dem biologischen Nutzen der natürlichen höheren Herzfrequenz. Der physiologische Zusammenhang zwischen Herzfrequenz und Größe des Tieres wird durch die allometrische Gesetzmäßigkeit beschrieben, nach dem sich die Herzfrequenz mit der Größe des Tieres erniedrigt. Somit haben kleine Tiere, wie die Maus, eine hohe Herzfrequenz. Die Herzfrequenz ist zu dem proportional zum Sauerstoff- und Energiebedarf pro kg Körpermasse des Tieres (West 1997). Mäuse gehören zu den Fluchttieren, die in ihrer natürlichen Umgebung einen biologischen Vorteil haben, wenn sie sich möglichst schnell vor ihren Fressfeinden in Sicherheit bringen können. Bei einer Fluchtreaktion erhöht sich der Sauerstoffund Energiebedarf der Maus. Somit könnte man sich vorstellen, dass die natürliche hohe Herzfrequenz der Maus wichtig ist, um sie bei einer Fluchtreaktion mit der dafür nötigen Menge an Sauerstoff und Energie zu versorgen. Bei unseren Labormäusen wirkte sich die niedrige Herzfrequenz der transgenen Tiere, aufgrund des Mangels an natürlichen Feinden, daher nicht negativ aus.

Um phänotypische Unterschiede bezüglich der Hypertrophie-Bildung und einer damit verbundenen Herzinsuffizienz der transgenen Tiere zu Vergleichstieren zu untersuchen, wurde das TAC-Modell gewählt. Wobei rund 20 % der Tiere diese OP nicht überlebten. Diese Tiere wurden nicht in die graphische Darstellung des Überlebens mit aufgenommen (Abb. 29). Da ein Stenosegradient unter 50 mmHg als nicht kritisch angesehen wird, wurden für die Auswertung nur Tiere oberhalb dieses Wertes verwendet (50 - 100 mmHg). Es ergibt sich außerdem eine günstige Verteilung der Stenosegradienten, die bei den WT-Tieren ähnlich ist wie bei den TG-Tieren (Abb. 28).

Die Herzfrequenz zeigte nach TAC einen Anstieg. Der Anstieg der Herzfrequenz erfolgte relativ synchron bei WT und TG. Wie bei einer TAC-OP beabsichtigt stieg das linksventrikuläre Gewicht in den Wochen nach der OP an, was ein Hinweis auf eine entstehende Hypertrophie ist (Abb. 29). Nach 12 Wochen TAC unterschied sich das Herzgewicht deutlich von Tieren ohne TAC (Abb. 30 B). Wobei sich bei den transgenen Tieren mit myokardialer PDE2-Überexpression ein leichter Trend einer geringeren TAC-induzierte Hypertrophie zeigte. Um daher eine weitere Größe zur Beurteilung der Hypertrophie zu haben, wurde die diastolische posteriore Wanddicke (PWthd) herangezogen, die sich bei einer Hypertrophie deutlich erhöht (Liao 2002). Auch dies bestätigte die Hypertrophiebildung nach TAC-OP (Abb. 29). Außerdem zeigte sich hier eine signifikant verminderte Wanddicke bei den transgenen Tieren in den späten Phasen der TAC (ab 7 Wochen). Somit scheint es, als ob die myokardiale Überexpression der PDE2, eine druckinduzierte Hypertrophie eindämmen könnte. Es besteht also die Möglichkeit einer schützenden Wirkung der myokardialen PDE2 vor der Bildung einer druckinduzierten Hypertrophie.

Bei einer Herzinsuffizienz kommt es, durch die

erhöhte beta-adrenerge Erregung, in den frühen Phasen zu einer chronisch erhöhten myokardialen cAMP-Konzentration, was schließlich zu molekularen und strukturellen Veränderungen des Herzens führt und somit den typischen Teufelskreis der Herzinsuffizienz in Gang setzt. Bei den transgenen Tieren findet sich von Geburt an eine erhöhte myokardiale PDE2-Expression und somit auch eine geringere myokardiale cAMP-Konzentration. Somit ist hier die Entstehung, des für Herzinsuffizienz typischen, cAMP-ausgelösten Teufelskreises von Anfang an vermindert. Dies könnte außerdem die geringfügig verminderte Neigung zur Bildung einer druckinduzierten Hypertrophie der transgenen Tiere erklären.

Die Kontraktilität ließ aufgrund der TAC-induzierten Hypertrophie nach, wobei sich hier kein wirklicher Unterschied zwischen WT und TG fand (Abb. 29). Im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe hingegen (Abb. 30 A) war ein stärkerer Abfall der Kontraktilität bei der transgenen Gruppe ersichtlich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der stabilste Phänotyp der myokardial PDE2A3-überexprimierenden Tiere die erniedrigte Herzfrequenz ist. Diese lag bei den transgenen Tieren rund 15 % (basal und mit Dobu) unter der vergleichbarer WT-Tiere. Die die Herzfrequenz-bestimmenden Oszillationen Kalzium- und Membranuhr lassen sich, wie schon gesagt, über die cAMP-Konzentration mittels HCN-Kanälen modulieren. Die myokardiale PDE2 hat einen direkten absenkenden Effekt auf die cAMP-Konzentration und beeinflusst somit beide Oszillationen der SAN-Zellen (Yaniv 2014).

Ein etabliertes Model, bei dem es ebenfalls zu einer Reduktion der Herzfrequenz kommt, ist der chronische atrioventrikuläre Block (AV-Block) beim Hund. Hierzu wird die Erregungsleitung am AV-Knoten gestört, so dass es zu einer verzögerten Erregung des AV-Knotens durch den SAN kommt. Dies führt zu einer erniedrigten Herzfrequenz und einer stärkeren Neigung zu Arrhythmien (de Groot 2000, Bignolais 2011). Nach einigen Wochen beobachtet man hier, durch eine kompensatorische Erhöhung des Schlagvolumens, eine Wiederherstellung des ursprünglichen Herzminutenvolumens; außerdem kommt es durch die erhöhte Volumenbelastung zu einer ventrikulären Hypertrophie (de Groot 2000, Bignolais 2011). Zudem findet sich hier eine verminderte Expression von cTNI und SERCA2, eine Erhöhung der Kontraktionskraft, der Auswurffraktion und, wie schon beschrieben, des Schlagvolumens (Bignolais 2011, Oros 2008). Somit teils sich dieser Phänotyp viele Gemeinsamkeiten mit dem PDE2A3-überexprimierenden Phänotyp, wohlgleich die erniedrigte Herzfrequenz bei den transgenen Tieren von Geburt an besteht. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die reduzierte Herzfrequenz der myokardial PDE2A3-überexprimierenden Mäuse den primären Phänotyp darstellt. Wohingegen die anderen Veränderungen, bezüglich Kontraktilität und Proteinexpression, den sekundären Phänotyp darstellen, welcher vom primären bedingt wird.

Im Model des AV-Blocks fanden sich außerdem Veränderungen bezüglich Ionenkanälen. So war z.B. die Aktivität des NCX erhöht und die Expression des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals Kv4.2 erniedrigt (Bignolais 2011, Oros 2008). Untersuchungen bezüglich Ionenkanälen stehen bei den PDE2A3-transgenen Tieren noch aus.

4.3. Die Rolle der PDE2 im Herzen

In dieser Dissertation wurden Daten zur Rolle der PDE2 im kardialen Fibroblasten und Myozyten erarbeitet. Aus der Literatur war u.a. bekannt:

• Der erhöhte cGMP-Spiegel durch die erhöhte CNP-Konzentration bei Herzinsuffizienz wird weitgehend von der myokardialen PDE2 reguliert, ohne dabei die Lusitropie des Herzens zu beeinflussen (Moltzau 2014).

Die Expression an myokardialer PDE2 steigt bei Herzinsuffizienz auf das Doppelte an (Mehel 2013).
Der inotrope Effekt einer akuten beta-adrenergen Stimulation kann durch eine myokardiale PDE2-Überexpression und eine damit verbundene Reduzierung der Amplitude des L-Type Ca²⁺-Stroms beseitigt werden (Mehel 2013).

• PDE2-überexprimierende Kardiomyozyten sind gegen eine NA-ausgelöste Hypertrophie geschützt (Mehel 2013).

• Die myokardiale PDE2 ist am Verkürzungsvermögen des Sarkomers (TNI- und cMyBP-C-Phosphorylierung) beteiligt; man findet eine Erhöhung nach PDE2-Inhibition (Mehel 2013, Mika 3013).

Zusätzlich konnten in dieser Arbeit folgende Effekte der kardialen PDE2 gefunden werden:

• Im kardialen Fibroblasten ist PDE2 beteiligt an der Regulation profibrotischer Faktoren wie α -SMA und CTGF und somit am Prozess des fibrotischen Remodelings. Mehr kardiale PDE2 führt zu mehr Fibrose. cGMP (Aktivierung der PDE2), führt hier zu einer Reduktion profibrotischer Faktoren.

• PDE2 ist im kardialen Fibroblasten beteiligt, an der Regulation der Änderung des cAMP-Spiegels nach beta-adrenerger Stimulation. Mehr PDE2 führt zu einem abgeschwächten cAMP-Anstieg.

• Im AMCM dominiert die PDE3 bei der durch den cGMP-Spiegel gesteuerten Regulation des cAMP-Spiegels, hinter der PDE2.

• Die myokardiale PDE2 hat einen Einfluss auf die Regulation der Herzfrequenz. Mehr PDE2 führt zu einer verminderten Herzfrequenz.

• Die myokardiale PDE2 hat über die Regulation der Herzfrequenz Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens. Die geringere Herzfrequenz bei mehr myokardialer PDE2, führt zu einer gesteigerten Kontraktilität.

• Eine Erhöhung der Expression an myokardialer PDE2, wie sie bei insuffizienten Herzen gefunden wird, führt zu einer Erniedrigung der PLB-Phosphorylierung. Außerdem ist die Phosphorylierung an Kontraktilitäts-regulierenden Proteinen, cMy-BP-C und TnI, erniedrigt.

• Eine myokardial erhöhte PDE2-Expression mindert eine druckinduzierte Hypertrophiebildung.

• Eine lebenslange myokardiale Überexpression der PDE2 scheint, zumindest bei Mäusen, vertretbar und zeigt keine negativen Auswirkungen.

• Eine kardiale Überexpression der PDE2 bleibt

auch in hohem Alter erhalten.

Es ist somit zu vermuten, dass die gefundene Erhöhung der myokardialen PDE2 bei Herzinsuffizienz ein Schutz- und Reparaturmechanismus des Herzens ist.

Bisher nicht diskutiert wurde die interzelluläre Beeinflussung der myokardial PDE2-überexprimierenden Zellen. So weiß man, dass Kardiofibroblasten in einem Gewebe, durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die Eigenschaften und den Phänotyp der Kardiomyozyten beeinflussen können (Kakkar 2010). Da die PDE2 im Kardiofibroblasten die Konzentration an profibrotischen Faktoren, und somit die Zusammensetzung des ECM beeinflussen kann, ist zu vermuten, dass dies auch einen Einfluss auf die umgebenden Kardiomyozyten in einem Gewebe hat. Auf der anderen Seite können Kardiomyozyten Substanzen abgeben (TGF-β, Interleukine...), welche einen Einfluss auf die Funktion der Kardiofibroblasten im Gewebe haben (Kakkar 2010). Auslöser hierfür kann eine mechanische Belastung oder die Bildung einer Hypertrophie sein. Vorstellbar wäre also auch, dass PDE2-transgene Kardiomyozyten Signalstoffe abgeben, welche den Phänotyp der umgebenden Kardiofibroblasten beeinflussen. Eine erhöhte Fibrosebildung der Herzen mit Kardiomyozyten-spezifischer PDE2-Überexpression konnte durch Pikro-Siriusrot-Färbung jedoch nicht gefunden werden (Daten hier nicht gezeigt).

Nicht näher nachgegangen wurde in dieser Dissertation der Frage, durch welche Transkriptionsfaktoren die PDE2-Expression reguliert wird, die ja bei Herzinsuffizienz erhöht ist. Bezüglich PDE3 gibt es Hinweise, dass hier der Transkriptionsfaktor CREB und der Repressor ICER beteiligt sind (Ding 2005b, Yan 2007). Zu PDE2 findet sich in der Literatur relativ wenig. Es könnte hier allerdings auch CREB beteiligt sein (Masson 1993).

Durch die schon bekannten und hier gefundenen Funktion der kardialen PDE2 steht somit fest, dass die PDE2 im Herzen eine vielschichtige Funktion besitzt, insbesondere im Bezug auf Herzinsuffizienz. Sie wäre somit ein gutes Ziel für einen pharmakologischen Eingriff. Pharmakologische Stoffe vermögen die Aktivität eines Enzyms zu modulieren. Somit könnte man sich eine Behandlung mit PDE2-Inhibitoren oder PDE2-Aktivatoren vorstellen. Eine Inhibition der kardialen PDE2 hätte im Fall der Herzinsuffizienz zwar eine Reduktion an Fibrose zur Folge, würde aber auch zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen. Dies wäre eine unverantwortliche Mehrbelastung des insuffizienten Herzens und würde die Morbidität erhöhen. So wirkt sich der die Herzfrequenz senkende Arzneistoff Ivabradin bei der Behandlung von Herzinsuffizienz positiv auf die Pathophysiologie aus (Swedberg 2010). Daher scheint hier eine Aktivierung der PDE2 sinnvoller. Diese Aktivierung ist nicht völlig mit einer Überexpression vergleichbar, bei der das Protein nur in seiner Konzentration erhöht wird. Außerdem steht die Entwicklung von selektiven Aktivatoren der PDE2 erst am Anfang. Dass eine Aktivierung der PDE2 theoretisch möglich ist konnte von Jäger et al. mit Versuchen an HEK293-Zellen mit Liganden der GAF-Domäne gezeigt werden (Jäger 2010).

Bei einer möglichen Behandlung von Herzinsuffizienz mit PDE2-Aktivatoren sollte außerdem bedacht werden, dass PDE2 auch in anderem Gewebe als dem Herzen vorkommt. So kommt sie außerdem im Gehirn vor und eine Inhibition führt hier (Versuch mit Mäuse und Ratten) zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung durch Erhöhung der neuronalen Plastizität (Boess 2004). Man könnte demnach vermuten, dass sich eine globale Aktivierung der PDE2 negativ auf die Merkfähigkeit auswirkt. Eine Herz-spezifische Wirkung wäre somit wünschenswert.

In dieser Dissertation konnte somit aufgezeigt werden, dass die kardiale PDE2 bezüglich der Therapie von Herzinsuffizienz einen möglichen pharmakologischen Eingriffspunkt darstellen könnte. Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob eine zusätzliche Aktivierung der myokardialen PDE2 tatsächlich im Sinne einer intrazellulären β -AR-Blockade die Progression zur Herzinsuffizienz verlangsamen oder Diskussion

verhindern könnte. Dies werden nun nachfolgende Forschungen zu diesem Thema zeigen.

V. DANKSAGUNGEN

Es ist selbstverständlich, dass so eine umfangreiche Dissertation nicht ohne die Hilfe vieler Menschen möglich gewesen wäre. Mein spezieller Dank gilt natürlich Herrn Prof. Dr. med. Ali El-Armouche, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, sich um die Bereitstellung der nötigen finanziellen Mittel gekümmert und mich über die Dauer meiner Dissertation hervorragend betreut hat. Außerdem war er Teil meines Thesis-Komitees, welches ein Bestandteil des MolMed-PhD-Programms in Göttingen ist. Somit geht außerdem mein Dank an meine anderen beiden Thesis-Komitee-Mitglieder, Herrn Dr. rer. nat. Viacheslav O. Nikolaev und Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Brockmöller. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, den Leiter des Institutes der Pharmakologie an der UMG, für die Möglichkeit an seinem Institut meine Dissertation anzufertigen.

Während meiner Dissertation konnte ich von Dr. Christiane Vettel vieles bezüglich wissenschaftlichem Denken und Arbeiten lernen, daher hier auch meinen Dank dafür. Auch an alle restlichen Mitglieder der AG El-Armouche, die ich während meiner Zeit als PhD kennen lernen durfte, gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die stetige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Dies beinhaltet namentlich Stefanie Meyer-Roxlau, Simranjit Singh, Dr. Ali Reza Saddatmand, Matthias Dewenter, Knut Hartmann, Thomas Groeber, Simone Napiany, Johanna Burgis, Merle Riedel, Ceyhun Cevirgen, Sebastian Ewens, Danilo Seppelt, Julius Emons, Simon Prohl und Kristian Otte. Danilo Seppelt und Julius Emons waren außerdem maßgeblich an der Generierung des Ad-PDE2A3 und des Plasmids für die PDE2-transgene Mauslinie beteiligt, auf denen mein Projekt aufgebaut war. Von Dr. Christiane Vettel stammen die Westernblots aus Abb. 25 A.

Bei Fragen zu Langendorff-Isolation, cAMP, cGMP oder PDEs konnte ich außerdem immer die Mitglieder der AG Nikolaev um Rat fragen. Außerdem wurde mir hier oft mit Gerätschaften und Substanzen ausgeholfen. Daher auch meinen Dank an alle Mitglieder der AG Nikolaev die mir stets behilflich waren (Konrad Götz, Ruwan Perera, Julia Sprenger, Dr. Daniela Hübscher, Filip Berisha, Karina Zimmermann).

Außerdem wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen ohne die Arbeit zahlreicher technischer Assistenten (TAs) zur Erhebung und Auswertung der Echokardiographie-Daten, der TAC-Operation, der Genotypisierung, der Zellpräperation und der Aufrechterhaltung eines reibungslosen Laboralltags. In alphabetischer Reihenfolge: Roland Blume, Beate Knocke, Ursula Leonhardt, Daniela Liebig-Wolter, Ines Müller, Iris Quentin, Beate Ramba, Daria Reher, Andreas Schraut, Krasimira Sharkova, Sarah Zafar, Marcel Zoremba. Hieran schließt sich gleich mein Dank an die Tierpfleger, die sich um das Wohl meiner Versuchstiere und deren Verpaarung gekümmert haben und an die Tierärzte, die mich stets über kranke Tiere informiert haben und schließlich an die Leiterin der Tiereinheit, Dr. Sarah Kimmina, für die Organisation des Ganzen.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Ursula Fünfschilling vom Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin für die Erzeugung der PDE2A3-transgenen Mauslinie, aus unserem Plasmid, durch Pronukleusinjektion.

Anschließend möchte ich mich noch bedanken bei allen maßgeblich am MolMed-PhD-Programm beteiligten Personen, insbesondere Herrn Dr. forest. Erik Meskauskas, Herrn PD Dr. rer. nat. Werner Albig und Prof. Dr. Matthias Dobbelstein.

Außerdem möchte ich mich bei allen Organisatoren und Betreuern bedanken, bei denen ich an einem MolMed-Kurs oder einer sonstigen Weiterbildung teilgenommen habe.

Bei allen Kollegen des Instituts der Pharmakologie und der befreundeten Institute möchte ich mich außerdem noch für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und das gesellige Miteinander, besonders am Mittagstisch, den sommerlichen Grilltagen und den (fast) regelmäßigen "Pizza-Dates", bedanken.

Außerdem Danke an Dr. Michael Wagner für das kritische Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift. Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem Bruder Christian bedanken, der mir einige Illustrationen für meine Dissertation erstellt hat und bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und ohne die ich jetzt sicher nicht da wäre wo ich bin und bei allen meinen Großeltern. Mein Vater nahm zudem die mühevolle Aufgabe auf sich meinen Text auf Fehler im Hinblick auf Interpunktion und Orthografie zu durchsuchen.

Nicht zu vergessen, vielen Dank an meine liebe Bekannte Daniela, die mich erst darauf gebracht hat, mich in Göttingen um eine PhD-Stelle zu bewerben. Falls ich in meiner Aufzählung jemanden unterschlagen haben sollte, dem auch noch mein Dank gebührt, dann noch vielen Dank an diese Person.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Altamirano J, Li Y, DeSantiago J, Piacentino V, Houser SR, Bers DM. *The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires* Na^+-Ca^{2+} exchanger function. The Journal of Physiology. 2006;575(3):845–854. doi:10.1113/jphysiol.2006.111252.

Amsallem E, Kasparian C, Haddour G, Boissel J-P, Nony P. *Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure (Review)*. Cochrane Database Syst Rev. 2005;(1):1–90. doi:10.1002/14651858.CD002230. pub2.

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, et al. *Myocardial response to infarction in the rat: morphometric mea-surement of infarct size and myocyte cellular hyper-trophy.* Am J Pathol. 1985;118:484–492.

Beavo JA, Francis SH, Houslay MD. *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*. CRC Press. 2006:1–768. ISBN 978-0-8493-9668-7

Bender AT, Beavo JA. *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use.* Pharmacological Reviews. 2006;58(3):488–520. doi:10.1124/pr.58.3.5.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental fin-dings and therapeutic strategies*. Pharmacology and Therapeutics. 2010;128(1):191–227. doi:10.1016/j. pharmthera.2010.04.005.

Bers DM. *Cardiac excitation–contraction coupling.* Nature. 2002;415:198–205.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(7):517–529. doi:10.1038/nrm1155.

Bignolais O, Le Quang K, Naud P, et al. *Early ion-channel remodeling and arrhythmias precede hypertrophy in a mouse model of complete atrioven*-

tricular block. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011;51(5):713–721. doi:10.1016/j.yjm-cc.2011.07.008.

Boess FG, Hendrix M, van der Staay F-J, et al. *Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance.* Neuropharmacology. 2004;47(7):1081–1092. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.040.

Börner S, Schwede F, Schlipp A, et al. *FRET measurements of intracellular cAMPconcentrations and cAMP analog permeabilityin intact cells*. Nat Protoc. 2011;6(4):427–438. doi:10.1038/nprot.2010.198.

Brodde O-E, Zerkowski H-R, Doetsch N, Motomura S, Khamassi M, Michel M. *Myocardial Beta-Adrenoceptor Changes in Heart Failure: Concomitant Reduction in Beta1- and Beta2 -Adrenoceptor Function Related to the Degree of Heart Failure in Patients With Mitral Valve Disease.* JACC. 1989;14(2):323– 331.

Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-po-lyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal. Biochem. 112;195–203.

Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, et al. *Persistent cAMP-Signals Triggered by Internalized G-Protein–Coupled Receptors*. Zastrow von M, ed. PLoS Biol. 2009;7(8):e1000172. doi:10.1371/journal.pbio.1000172.s025.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovascular Research. 2005;65(1):40–51. doi:10.1016/j. cardiores.2004.08.020.

Cann MJ. Sodium regulation of GAF domain function. Biochem Soc Trans. 2007;35(5):1032–1034.

Collins KA, Korcarz CE, Lang RM. Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetical*ly altered mice*. Physiol Genomics. 2003;13:227–239. doi:10.1152/physiolgenomics.00005.2003.

Conti M, Beavo J. *Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling*. Annu Rev Biochem. 2007;76(1):481–511. doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444.

Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R, Enouf J. *Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2010;48(4):633–644. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.11.012.

de Groot SHM, Schoenmakers M, Molenschot MMC, Leunissen JDM, Wellens HJJ, Vos MA. Contractile Adaptations Preserving Cardiac Output Predispose the Hypertrophied Canine Heart to Delayed Afterdepolarization-Dependent Ventricular Arrhythmias. Circulation. 2000;102(17):2145–2151. doi:10.1161/01.CIR.102.17.2145.

Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B. β -Adrenergic Receptor Subtype-Specific Signaling in Cardiac Myocytes from β_1 and β_2 Adrenoceptor Knockout Mice. Molecular Pharmacology. 2001;60:577–583.

Ding B, Abe J-I, Wei H, et al. *Functional Role of Phosphodiesterase 3 in Cardiomyocyte Apoptosis: Implication in Heart Failure*. Circulation. 2005a;111(19):2469–2476. doi:10.1161/01. CIR.0000165128.39715.87.

Ding B, Abe J-I, Wei H, et al. *A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis.* PNAS. 2005b;102(41):14771–14776. doi:10.1073/pnas.0506489102.

Dobrev D. Ion Channel Portrait of the Human Sinus Node: Useful for a Better Understanding of Sinus Node Function and Dysfunction in Humans? Circulation. 2009;119(12):1556–1558. doi:10.1161/CIR-CULATIONAHA.108.836866.

Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, et al. Trans-

forming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol. 1993;122:103–111.

Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, Sabatini F, Hatzelmann A. Inhibition of TGF- β induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. European Journal of Pharmacology. 2007;572(1):12–22. doi:10.1016/j. ejphar.2007.06.036.

Edel JB, deMello AJ. *Interphoton burst recurrence times: Single cell analysis in freely flowing solutions*. Appl Phys Lett. 2007;90(5):053904. doi:10.1063/1.2435327.

El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T. Inhibitory *G*-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. Cardiovascular Research. 2003;60(3):478–487. doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.014.

El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, et al. *Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun. 2006;346(3):700–706. doi:10.1016/j. bbrc.2006.05.182.

El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, et al. *Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007;43(2):223–229. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.05.003.

Eschenhagen T, Christine F, Ute R, et al. *Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system*. The FASEB Journal. 1997;11:683–694.

Eschenhagen T, Didie M, Heubach J, Ravens U, Zimmermann W-H. *Cardiac tissue engineering*. Transplant Immunology. 2002;9:315–321.

Eschenhagen T. β -adrenergic signaling in heart failu-

re—adapt or die. Nature Medicine. 2008;14(5):485–487. doi:10.1038/nm1752.

Felber LM, Cloutier SM, Kündig C, et al. *Evaluation of the CFP-substrate-YFP system for protease studies: advantages and limitations*. BioTechniques. 2004;36:878–885.

Gaburjakova M, Bal NC, Gaburjakova J, Periasamy M. *Functional interaction between calsequestrin and ryanodine receptor in the heart*. Cell Mol Life Sci. 2012;70(16):2935–2945. doi:10.1007/s00018-012-1199-7.

Gomez L, Breitenbucher JG. *PDE2 inhibition: Potential for the treatment of cognitive disorders*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2013;23(24):6522– 6527. doi:10.1016/j.bmcl.2013.10.014.

Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P. *Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation.* Basic Res Cardiol. 2010;105(5):643-50. doi:10.1007/ s00395-010-0097-0.

Grinnell F. *Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices*. Trends in Cell Biology. 2003;13(5):264–269. doi:10.1016/S0962-8924(03)00057-6.

Guazzi M. *Clinical Use of Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Chronic Heart Failure*. Circulation: Heart Failure. 2008;1(4):272–280. doi:10.1161/CIRCHE-ARTFAILURE.108.802116.

Gusterson RJ, Jazrawi E, M I. *The Transcriptional Co-activators CREB-binding Protein (CBP) and p300 Play a Critical Role in Cardiac Hypertrophy That Is Dependent on Their Histone Acetyltransferase Activity.* Journal of Biological Chemistry. 2002;278(9):6838– 6847. doi:10.1074/jbc.M211762200.

Hayashi T, Nagai Y. *Effect of pH on the stability of collagen molecule in solution*. J Biochem. 1973;73:999–1006.

He T-C, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW,

Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:2509–2514.

Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, et al. *Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz*. ZS Kardiologie. 2005;94(8):488–509. doi:10.1007/s00392-005-0268-4.

Iancu RV, Jones SW, Harvey RD. *Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiac Myocytes: A Computa-tional Study*. Biophysical Journal. 2007;92(9):3317–3331. doi:10.1529/biophysj.106.095356.

Jäger R, Schwede F, Genieser H-G, Koesling D, Russwurm M. *Activation of PDE2 and PDE5 by specific GAF ligands: delayed activation of PDE5*. British Journal of Pharmacology. 2010;161(7):1645–1660. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00977.x.

James J, Robbins J. *Signaling and Myosin-binding Protein C.* Journal of Biological Chemistry. 2011;286(12):9913–9919. doi:10.1074/jbc. R110.171801.

Jaisser F. Inducible Gene Expression and Gene Modification in Transgenic Mice. J Am Soc Nephrol. 2000;11:95–100.

Kakkar R, Lee RT. *Intramyocardial Fibroblast Myocyte Communication*. Circulation Research. 2010;106(1):47–57. doi:10.1161/CIRCRE-SAHA.109.207456.

Kapoun AM, Liang F, O'Young G, et al. *B-Type Natriuretic Peptide Exerts Broad Functional Opposition to Transforming Growth Factor- in Primary Human Cardiac Fibroblasts: Fibrosis, Myofibroblast Conversion, Proliferation, and Inflammation.* Circulation Research. 2004;94(4):453–461. doi:10.1161/01. RES.0000117070.86556.9F.

Kato H, Mizuno T, Mizuno M, et al. *Atrial natriuretic peptide ameliorates peritoneal fibrosis in rat peritonitis model*. Nephrology Dialysis Transplantation. 2012;27(2):526–536. doi:10.1093/ndt/gfr302.

Kavitha C, Rajamani K, Vadivel E. Coleus forskohlii:

A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(4):278–285.

Ke Y, Lei M, Solaro RJ. *Regulation of cardiac excitation and contraction by p21 activated kinase-1.* Prog Biophys Mol Biol. 2008;98(2-3):238–250. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2009.01.007.

Kimura H, Murad F. *Evidence for Two Different Forms of Guanylate Cyclase in Rat Heart.* The journal of biological chemistry. 1974;249:6910–6916.

Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. *3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs.* Adv Mater. 2014:1-7. doi:10.1002/adma.201305506.

Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi-Csizmadia A, Sellers JR. *Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II*. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(34):35557–35563. doi:10.1074/jbc. M405319200.

Kovesdi I, Hedley SJ. *Adenoviral Producer Cells*. Viruses. 2010;2(8):1681–1703. doi:10.3390/v2081681.

Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Kumar A, Parrillo JE. *Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-induced depression of cardiac myocyte contractility.* AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2007;292(5):R1900–R1906. doi:10.1152/ajpregu.00146.2006.

Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF. β 2-Adrenergic Receptor Actions in Neonatal and Adult Rat Ventricular Myocytes. Circulation Research. 1995;76:40–52. doi:10.1161/001.RES.76.1.40.

Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685. doi:10.1038/227680a0

Lakatta EG, Houser SR. *Myocyte Dysfunction in Heart Failure*. Science & Medicine. 1999:8–17.

Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A Cou-

pled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. Circulation Research. 2010;106(4):659–673. doi:10.1161/ CIRCRESAHA.109.206078.

Land S, Louch WE, Niederer SA, et al. *Beta-Adrenergic Stimulation Maintains Cardiac Function in Serca2Knockout Mice.* BPJ. 2013;104(6):1349–1356. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.042.

Larsson HP. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. The Journal of General Physiology. 2010;136(3):237–241. doi:10.1038/nature01922.

Layland J, Solaro RJ, Shah AM. *Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation.* Cardiovascular Research. 2005;66(1):12–21. doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.022.

Liao Y, Ishikura F, Beppu S, et al. *Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283:1703–1708. doi:10.1152/ajpheart.00238.2001.

Liew C-C, Dzau VJ. *Molecular Genetics and genomics of heart failure*. Nat Rev Gen. 2004;5:811–825. doi:10.1038/nrg1470.

Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. Nature. 2011;473:308–316. doi:10.1038/nature10145.

Liu J, Sirenko S, Juhaszova M, et al. *A full range of mouse sinoatrial node AP firing rates requires protein kinase A-dependent calcium signaling*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011;51(5):730– 739. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.07.028.

Lohse M, Engelhardt S, Eschenhagen T. *What Is the Role of* β -*Adrenergic Signaling in Heart Failu- re*? Circulation Research. 2003;93(10):896–906. doi:10.1161/01.RES.0000102042.83024.CA.

Loushin MK. The Effects of Anesthetic Agents on Cardiac Function. Handbook of Cardiac Anatomy,

Physiology, and Devices. 2007;1:171–180.

Lu D, Aroonsakool N, Yokoyama U, Patel HH, Insel PA. Increase in Cellular Cyclic AMP Concentrations Reverses the Profibrogenic Phenotype of Cardiac Myofibroblasts: A Novel Therapeutic Approach for Cardiac Fibrosis. Molecular Pharmacology. 2013;84(6):787–793. doi:10.1124/mol.113.087742.

Luo J, Deng Z-L, Luo X, et al. *A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system*. Nat Protoc. 2007;2(5):1236–1247. doi:10.1038/nprot.2007.135.

Masson N, Hurst HC, Lee KAW. Identification of proteins that interact with CREB during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Research. 1993;21(5):1163–1169.

Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. *Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(4):290–314. doi:10.1038/nrd4228.

McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, et al. *Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110) signaling in dilated andhypertrophic cardiomyopathy*. PNAS. 2007;104(2):612–617. doi:10.1073/pnas.0606663104.

Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, et al. *The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding.* PNAS. 2002;99(20):13260–13265. doi:10.1073/pnas.192374899.

Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erleburg I, Petridou S. *Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at lowdensity*. Cell Biology. 1996;93:4219–42223.

Mehel H, Emons J, Vettel C, et al. *Phosphodiesterase-2 Is Up-Regulated in Human Failing Hearts and Blunts b-Adrenergic Responses in Cardiomyocytes.* JAC. 2013;62(17):1596–1606. doi:10.1016/j. jacc.2013.05.057.

Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeis-

ter R. *PDEs create local domains of cAMP signaling*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2012;52(2):323–329. doi:10.1016/j. yjmcc.2011.08.016.

Mika D, Bobin P, Pomerance M, et al. *Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes*. Cardiovascular Research. 2013;100(2):336–346. doi:10.1093/cvr/cvt193.

Milhaud PG, Pondugula SR, Lee JH, et al. *Chloride secretion by semicircular canal duct epithelium is stimulated via beta 2-adrenergic receptors*. AJP: Cell Physiology. 2002;283(6):C1752–C1760. doi:10.1152/ajpcell.00283.2002.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. *Fluorescent indicators for* Ca^{2+} *based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature. 1997;388:882–887.

Molina CE, Leroy J, Richter W, et al. *Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase Type 4 Protects Against Atrial Arrhythmias*. JAC. 2012;59(24):2182– 2190. doi:10.1016/j.jacc.2012.01.060.

Moltzau LR, Meier S, Aronsen JM, et al. *Differential regulation of C-type natriuretic peptide-induced cGMP and functional responses by PDE2 and PDE3 in failing myocardium*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2014. doi:10.1007/s00210-013-0953-1.

Murad F, Mittal CK, Arnold WP, et al. *Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemo-globin and myoglobin.* Adv Cyclic Nucleotide Res. 1978;9:145-58.

Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. *The role of natriuretic peptides in cardioprotection*. Cardiovascular Research. 2006;69(2):318–328. doi:10.1016/j.cardiores.2005.10.001.

Olenych SG, Claxton NS, Ottenberg GK, Davidson MW. The Fluorescent Protein Color Palette. Curr Protoc Cell Biol. 2007;Unit 21.5.:Chapter 21. doi:10.1002/0471143030.cb2105s36.

Oros A, Beekman JDM, Vos MA. *The canine model with chronic, complete atrio-ventricular block*. Pharmacology and Therapeutics. 2008;119(2):168–178. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.03.006.

Ostap EM. *2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor*. Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2002;23:305–308.

Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, et al. *Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes*. Nature. 1982;300:611–615.

Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS. *Mechanism for the allosteric regulation ofphosphodiesterase 2A deduced from the X-raystructure of a near full-length construct.* PNAS. 2009;106(43):18225–18230. doi:10.1073/ pnas.0907635106.

Patel MB, Stewart JM, Loud AV, et al. *Altered function and structure of the heart in dogs with chronic elevation in plasma norepinephrine*. Circulation. 1991;84(5):2091–2100. doi:10.1161/01. CIR.84.5.2091.

Petretta M, Vicario MLE, Spinelli L, et al. *Combined effect of the force-frequency and length-tension mechanisms on left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy*. The European Journal of Heart Failure. 2002;(4):727–735.

Piper HM. *The calcium paradox revisited: An artefact of great heuristic value*. Cardiovascular Research. 2000;45:123–127.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure*. The New England Journal of Medicine. 1999;341(10):709–717.

Rall TW, Sutherland EW, Berthet J. *The relationship* of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: *IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reac-tivation of phosphorylase in liver homogenates.* The journal of biological chemistry. 1957;224:463–475.

Renart J, Reiser J, Stark GR. *Transfer of proteins* from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76(7):3116-20.

Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. *Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart*. Basic Res Cardiol. 2010;106(2):249–262. doi:10.1007/s00395-010-0138-8.

Rohr S. Cardiac Fibroblasts in Cell Culture Systems: Myofibroblasts All Along? J Cardiovasc Pharmacol. 2011;57:389–399.

Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, et al. *A Specific Pattern of Phosphodiesterases Controls the cAMP Signals Generated by Different Gs-Coupled Receptors in Adult Rat Ventricular Myocytes*. Circulation Research. 2006;98(8):1081–1088. doi:10.1161/01. RES.0000218493.09370.8e.

Rosenkranz S. TGF- $\beta 1$ and angiotensin networking in cardiac remodeling. Cardiovascular Research. 2004;63(3):423–432. doi:10.1016/j.cardiores.2004.04.030.

Russwurm C, Zoidl G, Koesling D, Russwurm M. *Dual Acylation of PDE2A Splice Variant 3*. The Journal of biological chemistry. 2009;284(38):25782–25790. doi:10.1074/jbc.M109.017194.

Sato M, Ozawa T, Inukai K, Asano T, Umezawa Y. *Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells.* nature biotechnology. 2002;20:287–294.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.* Biochem Biophys Res Commun. 1967; 7;28(5):815-20.

Shimokawa H, Rashid M. *Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine*. Trends Pharmacol Sci. 2007;28(6):296-302. doi:10.1016/j. tips.2007.04.006. **Sigusch HH**, Campbell SE, Weber KT. Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin. Cardiovasc Res. 1996;31:546 – 554.

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, et al. *Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous re-combination*. Nature. 1985;317:230-234.

Somerville JM, Aspden RM, Armour KE, Armour KJ, Reid DM. *Growth of C57Bl/6 Mice and the Material and Mechanical Properties of Cortical Bone from the Tibia*. Calcified Tissue International. 2004;74(5):469–475. doi:10.1007/s00223-003-0101-x.

Sprenger J, Nikolaev V. *Biophysical Techniques for Detection of cAMP and cGMP in Living Cells.* Int J Mol Sci. 2013;14(4):8025–8046. doi:10.3390/ ijms14048025.

Srivastava D, Olson EN. *A genetic blueprint for cardiac development*. Nature. 2000;407:221–226.

Sun Y, Cleutjens JP, Diaz-Arias AA, et al. *Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibro-sis in the rat.* Cardiovasc Res. 1994;28:1423–1432.

Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, Beavo JA. *Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3*. Circulation Research. 2007;101(8):811–818. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.154229.

Sutton MGSJ, Sharpe N. *Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy*. Circulation. 2000;101(25):2981–2988. doi:10.1161/01.CIR.101.25.2981.

Swedberg K, Komajda M, Böhm M, Borer JS et al. *Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study.* Lancet. 2010;11;376(9744):875-85. doi:10.1016/S0140-6736(10)61198-1.

Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. *Inhibition of cardiac myofibrob*- last formation and collagen synthesis by activation and overexpression f adenylyl cyclase. PNAS. 2005;102(2):437–442.

Tamargo J, López-Sendón J. *Novel therapeutic targets for the treatment of heart failure*. Nature Rev Drug Disc. 2011;10:536-555. doi:10.1038/nrd3431

Thomas KR, Capecchi MR. *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell. 1987;51(3):503–512. doi:10.1016/0092-8674(87)90646-5.

Tiburcy M, Meyer T, Soong PL, Zimmermann W-H. *Collagen-based Engineered Heart Muscle*. Methods in Molecular Biology. 2013;1181:1–20.

Tokudome T, Horio T, Soeki T, et al. *Inhibitory Effect of C-Type Natriuretic Peptide (CNP) on Cultured Cardiac Myocyte Hypertrophy: Interference between CNP and Endothelin-1 Signaling Pathways.* Endocrinology. 2004;145(5):2131–2140. doi:10.1210/en.2003-1260.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applica-tions.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76;4350–4354.

Vettel C*, Lämmle S*, Ewens S, et al. *PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways.* AJP: Heart and Circulatory Physiology. 2014;306(8):H1246–H1252. doi:10.1152/ajpheart.00852.2013.

Völler H, Nixdorff U, Flachskampf FA. *Assessment* of myocardial vitality with dobutamine echocardiography: current review. Zeitschrift fur Kardiologie. 2000; 89(10):921-931. doi: 10.1007/s003920070166

Vozenin MC, Lefaix JL, Ridi R, Biard DSF, Daburon F, Martin M. *The myofibroblast markers* α -SM actin and β -actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of fibrotic and normal skin. Cytotechnology. 1997;26:29–38.

West GB, Brown JH, Enquist BJ. A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws in Biology. Science. 1997;276:122–126.

Wilkins BJ, Dai Y-S, Bueno OF, et al. *Calcineurin/ NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy.* Circulation Research. 2004;94(1):110–118. doi:10.1161/01. RES.0000109415.17511.18.

Wittköpper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A. *Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological b-adrenoceptor signalling*. Cardiovascular Research. 2011;91(3):392–401. doi:10.1093/cvr/cvr058.

Yan C, Miller CL, Abe JI. *Regulation of Phosphodiesterase 3 and Inducible cAMP Early Repressor in the Heart*. Circulation Research. 2007;100(4):489–501. doi:10.1161/01.RES.0000258451.44949.d7.

Yaniv Y, Maltsev VA. Numerical modeling calcium and CaMKII effects in the SA node. Frontiers in Pharmacology. 2014;5(58):1–6. doi:10.3389/ fphar.2014.00058/abstract.

Zaccolo M, Movsesian MA. *cAMP and cGMP Signaling Cross-Talk: Role of Phosphodiesterases and Implications for Cardiac Pathophysiology*. Circulation Research. 2007;100(11):1569–1578. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.144501.

Zhu J, Yang Q, Dai D, Huang Q. *X-ray Crystal Struc*ture of Phosphodiesterase 2 in Complex with a Highly Selective, Nanomolar Inhibitor Reveals a Binding-Induced Pocket Important for Selectivity. J Am Chem Soc. 2013;135(32):11708–11711. doi:10.1021/ ja404449g.

Zimmer H-G. *The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers*. News Physiol Sci. 1998;13:1–8.

VII. ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
Å	Angström, 1 Å = 10 ⁻¹⁰ Meter
α -SMA	alpha-Glattmuskelaktin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
α MHC	lpha-Isoform der schweren Myosinkette
Ang l	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Adrenozeptor
AT1R	Angiotensinrezeptor 1
AT2R	Angiotensinrezeptor 2
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Angiotensinrezeptoren
AU	Willkürliche Einheit
AV	Atrioventrikular
β-AR	beta-Adrenozeptor
BAY	BAY 60-7/50
RDW	2,3-Butandionmonoxim
BIMP	Knochenmorphogenetische Proteine
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
DDM	Schlage pro Minute
BSA	Kinderserumaidumin
BW	Korpergewicht
	Kontrolle Fine Mauelinia
C5/BL/0	Elle Mausinie Kalzium Kation
Camkli	Califiouulin Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängiga Protoinkinasa II
	Kalzium- und Bikarbonat-frei HEPES-genufferte Hanks
halancier	te Salzlörung
CRP	CBEB-Bindeprotein
	Charge-coupled device
CFF	Hühnerembryoextrakt
CF	Kardiale Fobroblasten
CFP	Cvanfluorezierendes Protein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CGP	CGP 12177
cm	Zentimeter
СМ	Kardiale Myozyten
cMyBP-C	kardiales Myosinbindeprotein C
CMV	Zytomegalievirus
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
CO	Herzzeitvolumen, Herzminutenvolumen
CO,	Kohlendioxid
CRÊ	cAMP Responselement
CREB	cAMP Responselement-Bindeprotein
CSQ	Calsequestrin
CTGF	Bindegewebewachstumsfaktor
cTNI	Kardiales Troponin I
DAG	1,2-Diacylglycerin
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DD	Diastolische Depolarisation

dh	des heißt
	uas nenst Geographica produktionen katieren katieren katieren k
DHPR	Spannungsabnangiger L-Typ-Kaiziumkanai
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferter Saline
Dr.	Doktor
dsDNA	Einzelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle's balancierte Salzlösung
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECT	Konstruiertes Bindegewebe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Auswurffraktion
EGFP	Verbessertes grün-fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
EHM	Konstruierter Herzmuskel
EHNA	(+)-ervthro-9-(2-Hvdroxy-3-nonyl)adenin
FHT	Konstruiertes Herzaewebe
FIA	Enzymimmunotest
FIK1	ETS-Domäne enthaltendes Protein
FNI	Europäisches Neurobiologisches Institut
FPAC	Austauscherproteine aktiviert durch cAMP
FRK	Extrazellular-signal regulierte Kinase
otal	et alia und andere"
Et al.	Fraktionelle Elächenänderungsrate
ERC	Fötalos Kälborsorum
	Förstor-Posonanzonorgiotransfor
	Fraktionalla Varkürzungsfraktion
	Fiakuonelle verkuizungsnakuon
	Cramm
y CADDU	Glucarinaldahud 2 phasabat Dahudraganasa
	Giycennaldenyd-5-phosphat-Denydrogenase
	Guanyialzykiase isoloinn A
	Gruh-huoreszlerendes Protein
GHZ	Giganerz
n	Stunde
HCN	Hyperpolarisationsaktivierte zyklische Nukleotid-verstarkte
Kationen	ikanale
HE	Hamatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsaure
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzellen Typ 293
HUVEC	Menschliche Endotheizeilen aus der Nabelvene
ı.p.	Intraperitoneal = In die Peritonealnonie
-	Proteinphosphataseinnibitor iyp i
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC 50	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten
und verv	vandter Gesundheitsprobleme
ICI	ICI 118551
IOA	Isolierte Organapparatur
IP3R	Inositoltrisphosphaterezeptor
ISO	Isoprenalin
IVC	Individuell ventilierte Käfige
К	Wandspannung
K+	Kalium-Kation
kb	Kilobase
kHz	Kiloherz

KG	Körperaewicht
LTCC	I-Typ Kalziumkanal
LVM	Linksventrikuläre Masse
MDP	Maximales diastolisches Potential
med.	medicinae
ma	Milligramm
Ma ²⁺	Magnesium-Kation
MHz	Megaherz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mМ	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilber
mΝ	Millinewton
Mn ²⁺	Mangan-Kation
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-RNA
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MWCO	Nominal Molecular Weight Cut-Off
MyoCF	Kardiale Myofibroblasten
n	Grundgesamtheit
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natrium-Kation
NCX	Natrium-Kalcium-Austauscher
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
NKM	Nicht-Kardiomyozyten
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NRCF	Neonatale kardiale Rattenfibroblasten
NRCM	Neonatale kardiale Rattenmyozyten
NYHA	New York Herzgesellschaft
OP	Operation
р	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDE2	Phoshodiesterase Typ 2
PDE3	Phoshodiesterase Typ 3
PDE4	Phoshodiesterase Typ 4
рН	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffio-
nen-Aktiv	ität
РКА	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PLB	Phospholamban
PLB-Ser1	5 An Ser16 phosphoryliertes Phospholamban
PLB-Thr1	7 An Thr17 phosphoryliertes Phoshpolamban
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ ATPase
PP-1A	Proteinphosphatase 1A
PP-2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
SAN	Sinusknoten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

SERCA2	Sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Kalzi-
um-ATPa	se Isotyp 2
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SNP	Natriumnitroprussid
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
rer. nat.	rerum naturalium
RT	Raumtemperatur
SV	Schlagvolumen
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TnC	Troponin C, Kalzium-bindende Untereinheit
Tnl	Troponin I, inhibitorische Untereinheit
U	Enzymeinheit
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
vergl.	vergleiche
Vol.%	Volumenprozent
WT	Wildtyp
YFP	Gelbfluoreszierendes Protein
Zn ²⁺	Zink-Kation
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
μΙ	Mikroliter

81

PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways

C. Vettel,^{1,4}* S. Lämmle,^{1,4}* S. Ewens,^{1,4} C. Cervirgen,^{1,4} J. Emons,^{1,4} A. Ongherth,^{1,4} M. Dewenter,^{1,4} D. Lindner,^{2,5} D. Westermann,^{2,5} V. O. Nikolaev,^{3,4} S. Lutz,^{1,4} W. H. Zimmermann,^{1,4} and A. El-Armouche^{1,4,6}

¹Institute of Pharmacology, University Medical Center Göttingen, Germany; ²Department of General and Interventional Cardiology, University Heart Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany; ³Department of Cardiology, University Medical Center Göttingen, Germany; ⁴German Center for Cardiovascular Research, partner site Göttingen, Germany; ⁵German Center for Cardiovascular Research, partner site Hamburg/Kiel/Luebeck, Germany; and ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Technology-Dresden, Germany

Submitted 29 October 2013; accepted in final form 28 January 2014

Vettel C, Lämmle S, Ewens S, Cervirgen C, Emons J, Ongherth A, Dewenter M, Lindner D, Westermann D, Nikolaev VO, Lutz S, Zimmermann WH, El-Armouche A. 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: H1246-H1252, 2014. First published February 15, 2014; doi:10.1152/ajpheart.00852.2013.-Recent studies suggest that the signal molecules cAMP and cGMP have antifibrotic effects by negatively regulating pathways associated with fibroblast to myofibroblast (MyoCF) conversion. The phosphodiesterase 2 (PDE2) has the unique property to be stimulated by cGMP, which leads to a remarkable increase in cAMP hydrolysis and thus mediates a negative cross-talk between both pathways. PDE2 has been recently investigated in cardiomyocytes; here we specifically addressed its role in fibroblast conversion and cardiac fibrosis. PDE2 is abundantly expressed in both neonatal rat cardiac fibroblasts (CFs) and cardiomyocytes. The overexpression of PDE2 in CFs strongly reduced basal and isoprenaline-induced cAMP synthesis, and this decrease was sufficient to induce MyoCF conversion even in the absence of exogenous profibrotic stimuli. Functional stress-strain experiments with fibroblast-derived engineered connective tissue (ECT) demonstrated higher stiffness in ECTs overexpressing PDE2. In regard to cGMP, neither basal nor atrial natriuretic peptide-induced cGMP levels were affected by PDE2, whereas the response to nitric oxide donor sodium nitroprusside was slightly but significantly reduced. Interestingly, despite persistently depressed cAMP levels, both cGMP-elevating stimuli were able to completely prevent the PDE2induced MyoCF phenotype, arguing for a double-tracked mechanism. In conclusion, PDE2 accelerates CF to MyoCF conversion, which leads to greater stiffness in ECTs. Atrial natriuretic peptide- and sodium nitroprusside-mediated cGMP synthesis completely reverses PDE2-induced fibroblast conversion. Thus PDE2 may augment cardiac remodeling, but this effect can also be overcome by enhanced cGMP. The redundant role of cAMP and cGMP as antifibrotic meditators may be viewed as a protective mechanism in heart failure.

phosphodiesterase 2; cardiac fibroblasts; myofibroblast; engineered connective tissue; cAMP; cGMP

FIBROTIC REMODELING IS A COMMON feature of the diseased heart. Inflammatory processes, mechanical stress, and enhanced

growth factor secretion result in the induction of a contractile subtype of fibroblasts, termed cardiac myofibroblasts (MyoCFs) (6, 20). MyoCFs share characteristics with both fibroblasts and smooth muscle cells, i.e., they are able to produce a variety of matrix proteins as well as to express, e.g., α -smooth muscle actin (α -SMA). This transformation is essential for postinjury scar formation and hence for organ integrity and function, e.g., after myocardial infarction. However, the unusual persistent, proliferative, and migratory properties of MyoCFs lead to an excessive accumulation of extracellular matrix that exceeds the scar area and over time promotes diastolic dysfunction and contributes to heart failure progression (25).

cAMP and cGMP have been shown to display antifibrotic properties by, e.g., inhibiting α -SMA/connective tissue growth factor (CTGF) expression and collagen synthesis (7, 18, 23). Both cAMP and cGMP are central regulators of the cardiovascular system often with opposing functions. For example, cAMP and its effector protein kinase A mediate the acute adaption of cardiac excitation-contraction coupling and cardiac growth, whereas cGMP is associated with vasodilatation and the activation of antihypertrophic signaling in response to nitric oxide (NO) or atrial natriuretic peptide (ANP) (26). To maintain the specificity of downstream target activation, localization and duration of cAMP/cGMP signals are tightly controlled. This spatiotemporal restriction of cAMP/cGMP concentrations is mainly achieved by phosphodiesterases (PDEs), which catalyze nucleotide hydrolysis. Until now, several different isoforms from the PDE families 1-5 and 8 have been described in the heart (12). Among those, the cGMP/cAMPhydrolyzing PDE2 has the unique feature to be activated by cGMP via a cGMP-specific PDE motif located in the regulatory domain of the enzyme (15). The allosteric activation leads to an increase in PDE2-dependent cAMP hydrolysis by ~10fold (24). By this mechanism, PDE2 allows cGMP-generating stimuli such as ANP or NO to negatively regulate cAMP levels. We recently showed that myocardial PDE2 is upregulated in human and experimental heart failure and that PDE2 upregulation in cardiomyocytes (CMs) could be a part of the well-known \beta-adrenergic receptor (β-AR) desensitization process, and hence its activation may prove beneficial for CM survival in terms of protection from chronic β-AR overstimulation (11).

^{*} C. Vettel and S. Lämmle contributed equally.

Address for reprint requests and other correspondence: A. El-Armouche, Inst. of Pharmacology, Univ. Medical Ctr. Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany (e-mail: ali.el-armouche@med.uni-goettingen.de).

H1247

PDE2 INDUCES FIBROBLAST CONVERSION

In this study, we addressed the impact of PDE2 on cAMPand cGMP-mediated signal transduction with regard to cardiac fibroblast (CF) conversion. We found that PDE2 overexpression enhances primarily cAMP degradation and induces fibroblast (CF) to MyoCF transformation, which led functionally to higher stiffness in fibroblast-derived engineered connective tissues (ECTs). However, despite the initial expectation of a cGMP-dependent increase in PDE2 activity and an enhancement of MyoCF induction, we found that cGMP-elevating stimuli ANP and NO-donor sodium nitroprusside (SNP) may fully antagonize PDE2-induced MyoCF phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Reagents for cell culture were purchased from Gibco Life technologies. Cells were grown in a humidified incubator with 5% CO_2 -95% room air at 37°C. All reagents were of highest quality available and obtained from commercial sources: Biomol, Sigma-Aldrich, Appli-Chem, Carl Roth, Tocris, and Biotrend.

Animal care and culture of rat neonatal cardiac cells. Protocols for the care and use of the rats were carried out in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health and approved by the Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Germany). Neonatal rat heart cells were isolated from newborn rats (*day* 0 to 3) as previously described (27). Cells were preplated for 60 min to separate fibroblasts from the nonadhering CMs. For CF experiments, cells were used at *passage 1*.

Engineered connective tissues and recombinant adenoviruses. CFs were infected under serum-starved conditions with adenovirus (Ad)enhanced green fluorescent protein (EGFP) or Ad-PDE2 for 4 h. Cells were harvested by trypsination, and engineered connective tissues (ECT) were prepared as previously described (19, 28). After 4 days in culture, ECT was transferred into temperature-controlled organ baths for a stress-strain analysis. The recombinant adenoviruses were generated according to the method published by He et al. (3). For recombinant PDE2 adenovirus, the murine PDE2A3 transcript was cloned (NM_001008548.3). All viruses code in addition for EGFP. Infections were carried out under serum-free conditions over a period of 48 h.

Immunoblot, immunofluorescence, cAMP/cGMP detection. Immunoblot analysis was carried out as recently described (22). The following antibodies were used: anti- α -smooth muscle-actin (1: 2,000), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -tubulin (1:2,000) from Sigma-Aldrich, anti-PDE2 (1: 200), anti- α -superiments by fluorescence resonance energy transfer (FRET), CFs were infected with Ad-exchange protein directly activated by cAMP 2 (Epac2) camps for 48 h. Analysis was carried out according to recently published protocols (13, 14).

Statistics. Results are presented as means \pm SE. Data sets were compared by Student's *t*-test to assess differences between groups. *P* values of <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Overexpressed PDE2 induces the profibrotic factors α -SMA and CTGF that translates into a higher stiffness of ECT. Based on our initial finding of a PDE2 upregulation in total heart tissue, we first analyzed endogenous PDE2 expression in isolated neonatal rat CMs and CFs. To ensure a successful fractioning of these two cell populations, cell lysates were

additionally probed for respective marker genes, calsequestrin for CMs and procollagen I for the CF population. As shown in Fig. 1, PDE2 expression was 2.5-fold higher in CFs compared with CMs (Fig. 1, A and B).

To better understand PDE2 function in CFs, we overexpressed this enzyme by using recombinant adenoviruses encoding for either PDE2 and EGFP or EGFP alone as control. PDE2 activity has been described for both cytosolic and membrane cell fractions most probably because of variances in the NH₂-terminus of the known splice variants PDE2A1-3 (17). Immunofluorescence staining showed that overexpressed PDE2 displayed a mostly cytosolic distribution in CFs and was additionally accumulated at perinuclear membranes (Fig. 2A). Expectantly, basal cAMP levels in total cell lysate were markedly abolished compared with those in controls (Fig. 2B). Moreover, α-SMA and CTGF expression were distinctly increased in PDE2-CFs by 3.5- and 2.3-fold, respectively (Fig. 2, C and D). Similar results were obtained when we analyzed α -SMA and CTGF by immunofluorescence, where PDE2 CFs showed greater stress fiber formation and higher abundance of CTGF containing vesicles (Fig. 2E).

To address functional consequences, we generated ECT, which comprise adenovirally transduced CFs embedded in a collagen matrix to form a tissue ring (Fig. 2*G*). After condensation, ECTs were stretched stepwise, and the passive force generated was measured at each ECT strain. PDE2 overexpression led to an increase in passive force, indicating a higher stiffness of the tissue (Fig. 2*F*).

 β -AR receptor-induced accumulation of cAMP is partially inhibited by PDE2 but does not prevent PDE2-induced MyoCF phenotype. Several stimuli that promote the synthesis of cAMP have been shown to counteract TGF- β -induced fibroblast dif-



Fig. 1. Phosphodiesterase 2 (PDE2) expression in neonatal rat cardiac fibroblasts (CFs) and myocytes (CMs). A: representative immunoblots with procollagen I and calsequestrin (CSQ) as marker proteins for CFs and CMs, respectively. B: quantification of PDE2 expression of normalized to GAPDH. rel, Relative. Values are means \pm SE; n = 5. * $P \le 0.05$ vs. CMs.



AJP-Heart Circ Physiol • doi:10.1152/ajpheart.00852.2013 • www.ajpheart.org

Rapid Report

H1249



Fig. 3. Impact of PDE2 on cAMP accumulation and fibrotic markers in isoprenaline-stimulated cells. A: representative fluorescence resonance energy transfer traces normalized to basal cyan fluorescent protein (CFP)-to-yellow fluorescent protein (YFP) ratio after treatment with Iso (50 nM) and PDE2-specific inhibitor BAY 60-7550 (BAY; 100 nM). Values are means \pm SE. *P \leq 0.05 vs. EGFP, Iso. B: average of the responsiveness to 50 nM Iso as percentage of maximal response (Iso + BAY); n = 3 to 4. Representative immunoblots (C) and quantification of α -SMA and CTGF expression (D) after 24 h of stimulation with Iso normalized to tubulin; n = 3 with 2 to 3 replicates each. GFP, green fluorescent protein. Values are means \pm SE; *P \leq 0.05 vs. EGFP, basal.

ferentiation. Among those are, e.g., prostaglandine-2 and the β_1/β_2 -AR agonist isoprenaline (Iso) (8). To test the contribution of PDE2 to the degradation of β -AR-induced cAMP increase, we additionally transduced CFs with the cytosolically distributed Epac2-camps FRET biosensor for cAMP. As documented by the representative single trace of cyan fluorescent protein/yellow fluorescent protein (Fig. 3*A*), stimulation with Iso led to a modest but robust accumulation of cAMP in CFs. This increase was reduced by 75% under conditions of high PDE2 abundance and consequently restored when PDE2-specific inhibitor Bay 60-7550 was additionally applied (Fig. 3, *A*) and *B*). We next analyzed α -SMA and CTGF expression after Iso stimulation. Control cells displayed a relatively low expression of both α -SMA and CTGF, which was not further reduced by Iso application (Fig. 3, *C* and *D*). Most importantly, the remaining Iso-induced cAMP pool in PDE2 transduced CFs did not counteract PDE2-mediated MyoCF induction.

PDE2-mediated fibroblast conversion is abolished by cGMPgenerating stimuli. When intracellular cGMP concentrations exceed 500 nM, PDE2 is not only allosterically activated by this cyclic nucleotide but is also involved in its hydrolysis (24). Cellular cGMP is generated by either particulate or cytosolic

Fig. 2. Impact of PDE2 on basal cAMP synthesis, fibrotic markers, and tissue characteristics. Localization of recombinant PDE2 (*A*) and representative pictures of α -smooth muscle actin (α -SMA) and connective tissue growth factor (CTGF) expression (*E*) was visualized by immunofluorescence. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and viral enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression was recorded as a control. *B*: basal cAMP concentration measured by enzyme immunoassay; n = 5. Ad, adenovirus. Representative immunoblots (*C*) and quantification of α -SMA and connective tissue growth factor expression (*B*) with 1-4 replicates each. *F*: stiffness of engineered connective tissue (ECT) (stress-strain curve; n = 5 with 4 replicates each). *G*: fluorescent image (Zeiss SteREO Lumar.V12) of representative ECT. Values are means \pm SE. **P* \leq 0.05 vs. EGFP.



H1250



Fig. 4. Impact of PDE2 on cGMP accumulation and fibrotic markers in atrial natriuretic peptide (ANP)/sodium nitroprusside (SNP)stimulated cells. A: global cGMP levels were determined by enzyme immunoassay after a stimulation with either 1 μM ANP or 40 μM SNP for 10 min; n = 5 with 3 replicates each. B: averages of the responsiveness to 100 nM ANP or 1 mM SNP measured by FRET and normalized to CFP-to-YFP ratios after treatment with 150 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and 30 μ M forskolin; n = 4-6. Representative immunoblot (C) and quantification of CFs (D) treated with 1 µM ANP or 40 μ M SNP for 24 h before lysis; n = 5. Values are means \pm SE; **P* < 0.05 vs. Ad-EGFP; #*P* < 0.05 vs. Ad-EGFP, basal; \$*P* < 0.05 vs. Ad-PDE2, basal. E: schematic overview: cAMP and cGMP counteract fibroblast to myofibroblast conversion. In fibroblasts, PDE2 predominantly decreases cAMP. The decrease in cAMP is compensated by cGMP elevation stimuli. C, control; ns, not significant; NO, nitric oxide; HF, heart failure.

guanylyl cyclase. Therefore, we tested how PDE2 affects basal, ANP/particular guanylyl cyclase- and NO/soluble guanylyl cyclase-induced cGMP signal amplitudes and is in turn affected in its cAMP-hydrolyzing activity. Basal cGMP abundance was similar to those of control cells and hence not compromised by PDE2 (Fig. 4A). Both ANP and SNP led to a robust two- to threefold increase in cGMP, with a slightly reduced response in SNP/PDE2 compared with SNP/EGFP

(2.2- and 3-fold, respectively). In regard to cAMP, both stimuli led to higher levels in control cells, whereas cAMP accumulation was either blunted (ANP) or decreasing (SNP) in PDE2overexpressing fibroblasts (Fig. 4B).

We next addressed how elevated cGMP levels and the resulting loss in cAMP affect PDE2-induced MyoCF phenotype. ANP and SNP reduced basal α -SMA content but had no further impact on basal CTGF expression in control cells.

Rapid Report

PDE2 INDUCES FIBROBLAST CONVERSION

However, ANP, as well as SNP, completely normalized both α -SMA and CTGF expression in PDE2 cells (Fig. 4, *C* and *D*). Similar results were obtained when stress fiber formation and CTGF content were visualized by immunofluorescence (data not shown).

DISCUSSION

In our study, we show that PDE2 overexpression has two important consequences on CF physiology. First, PDE2 led to an expected decrease in cellular cAMP levels and, second, resulted in the induction of α -SMA and CTGF synthesis in the absence of specific profibrotic stimuli. It has been described that fibroblasts convert into MyoCFs under standard twodimensional culture conditions mainly because of rigidity of the culture substrate and autocrine TGF- β stimulation (2, 10, 16). To maintain close to the physiological phenotype, we used passage 1 fibroblasts, where we observed moderate α -SMA and CTGF expression (see Fig. 2C). Our data suggest that under conditions of balanced pro- and antifibrotic signaling, basal cAMP generation is essential to prevent a fully fibroblast conversion. However, since these observations were obtained in a two-dimensional culture, the important question was whether this MyoCF induction would also occur in a more complex tissue-like environment and, consequently, affect its mechanistic properties. Cultivation of CFs in relaxed threedimensional matrixes has been described to cause a substantial downregulation of α -SMA (16, 21). Despite these more physiological conditions, PDE2 expression indeed led to greater stiffness ("passive force" due to chronic constriction based on matrix remodeling) of three-dimensional ECTs subjected to stress strain analyses. These measurements are, however, not an indicator of acute contractile responsiveness ("active force" due to MyoCF contraction), which was not determined here. Taken together, these results argue for a critical role of the PDE2-regulated cAMP pool in blocking signal pathways activated independently of cell surface interactions and allow a valid impression of how these molecular changes directly affect tissue characteristics.

As recently published, TGF-\beta-transformed CFs are less responsive to cAMP-generating stimuli due to a downregulation of adenylyl cyclases and an upregulation of PDEs. The TGF-B-induced transformation was demonstrated to be reversible by a pharmacologically increased adenylyl cyclase activity (9). Our FRET experiments showed a markedly reduced but not completely diminished response to β-AR stimuli in PDE2 cells. The question we posed in this context was whether this additional presence of cAMP generated by endogenous stimuli is sufficient to reverse PDE2-induced acceleration of CFs to MyoCF transition. However, in our setting, β -AR activation was neither able to compensate the loss in basal cAMP accumulation in PDE2-CFs nor showed any significant effect on α -SMA or CTGF in control cells. Our results are therefore well in line with the fact that β_1/β_2 -blockers such as carvedilol or propranolol used to treat heart failure patients do not further enhance fibrotic remodeling. Similar to cAMP, the signal molecule cGMP generated either by natriuretic peptide receptors or via NO has been shown to oppose the expression of α -SMA and CTGF in lung, renal, or CFs (1, 4, 5, 7). PDE2 is a dual-substrate PDE capable of hydrolyzing both cAMP and cGMP but is predominately activated by the latter. The initial expectation was therefore rather an enhancement of the MyoCF phenotype due to an increase in PDE2 activity and further reduced cAMP levels (Fig. 4*B*). Interestingly, the opposite was the case: ANP/SNP stimulation actually led to an inhibition of α -SMA and CTGF expression in PDE2-CFs, which despite diminished cAMP levels was similar to ANP/SNP-treated EGFP-CFs (Fig. 4, *B* and *C*). Thus our data suggest that exogenous activation of cGMP pathways is able to bypass PDE2-mediated degradation of cAMP and reverses the consequent induction of α -SMA and CTGF (Fig. 4*D*). To our knowledge this study provides the first comparative aspect between these two antifibrotic signaling pathways.

In summary, our findings emphasize the critical role of basal cAMP in the absence of cGMP-elevating stimuli and the PDEs regulating its accumulation. In the context of, e.g., cardiac disease, our data indicate that a PDE-dependent loss in cAMP accumulation could be overcome by higher cGMP levels, which allows a therapeutic option in the treatment of heart failure that can be considered beneficial not only for the fibroblast but also for CM population.

GRANTS

This study was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants DFG EL 270/5-1 (to A. El-Armouche), SFB 1002 (to V. O. Nikolaev, S. Lutz, W. H. Zimmermann, and A. El-Armouche), and IRTG 1816 (to C. Vettel, V. O. Nikolaev, S. Lutz, W. H. Zimmermann, and A. El-Armouche) and the German Centre for Cardiovascular Research.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.V., S.L., D.W., V.O.N., S. Lutz, W.H.Z., and A.E.-A. conception and design of research; C.V., S.L., S.E., C.C., J.E., A.O., and D.L. performed experiments; C.V., S.L., S.E., C.C., J.E., M.D., D.L., and V.O.N. analyzed data; C.V., S.L., S.E., C.C., J.E., D.L., D.W., S. Lutz, and A.E.-A. interpreted results of experiments; C.V. and S.L. prepared figures; C.V., S.L., V.O.N., W.H.Z., and A.E.-A. drafted manuscript.

REFERENCES

- Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, Sabatini F, Hatzelmann A. Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol* 572: 12–22, 2007.
- Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. J Cell Biol 172: 259–268, 2006.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509–2514, 1998.
- Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factorbeta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 94: 453–461, 2004.
- Kato H, Mizuno T, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Kinashi H, Nagura F, Maruyama S, Noda Y, Yamada K, Matsuo S, Ito Y. Atrial natriuretic peptide ameliorates peritoneal fibrosis in rat peritonitis model. *Nephrol Dial Transplant* 27: 526–536, 2012.
- Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 106: 1675–1680, 2010.
- Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res* 102: 185–192, 2008.

Rapid Report

H1252

PDE2 INDUCES FIBROBLAST CONVERSION

- Liu X, Li F, Sun SQ, Thangavel M, Kaminsky J, Balazs L, Ostrom RS. Fibroblast-specific expression of AC6 enhances beta-adrenergic and prostacyclin signaling and blunts bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L819–L829, 2010.
- 9. Lu D, Aroonsakool N, Yokoyama U, Patel HH, Insel PA. Increase in cellular cyclic AMP concentrations reverses the pro-fibrogenic phenotype of cardiac myofibroblasts: a novel therapeutic approach for cardiac fibrosis. *Mol Pharmacol* 84: 787–793, 2013.
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4219–4223, 1996.
- Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittkopper K, Seppelt D, Dewenter M, Lutz S, Sossalla S, Maier LS, Lechene P, Leroy J, Lefebvre F, Varin A, Eschenhagen T, Nattel S, Dobrev D, Zimmermann WH, Nikolaev VO, Vandecasteele G, Fischmeister R, El-Armouche A. Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyccytes. J Am Coll Cardiol 62: 1596–1606, 2013.
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. J Mol Cell Cardiol 52: 323–329, 2012.
- Miller CL, Cai Y, Oikawa M, Thomas T, Dostmann WR, Zaccolo M, Fujiwara K, Yan C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res Cardiol* 106: 1023–1039, 2011.
- Nikolaev VO, Gambaryan S, Lohse MJ. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. Nat Methods 3: 23–25, 2006.
- Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS. Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18225–18230, 2009.
- 16. Rohr S. Cardiac fibroblasts in cell culture systems: myofibroblasts all along? J Cardiovasc Pharmacol 57: 389–399, 2011.
- 17. Russwurm C, Zoidl G, Koesling D, Russwurm M. Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J Biol Chem* 284: 25782–25790, 2009.
- 18. Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by

activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 437–442, 2005.

- Tiburcy M, Didie M, Boy O, Christalla P, Doker S, Naito H, Karikkineth BC, El-Armouche A, Grimm M, Nose M, Eschenhagen T, Zieseniss A, Katschinksi DM, Hamdani N, Linke WA, Yin X, Mayr M, Zimmermann WH. Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. *Circ Res* 109: 1105–1114, 2011.
- van den Borne SW, Diez J, Blankesteijn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 7: 30–37, 2010.
- Vozenin MC, Lefaix JL, Ridi R, Biard DS, Daburon F, Martin M. The myofibroblast markers alpha-SM actin and beta-actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of fibrotic and normal skin. *Cytotechnology* 26: 29–38, 1998.
- Wuertz CM, Lorincz A, Vettel C, Thomas MA, Wieland T, Lutz S. p63RhoGEF-a key mediator of angiotensin II-dependent signaling and processes in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 24: 4865–4876, 2010.
- Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6386–6391, 2008.
- Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 100: 1569–1578, 2007.
- Zamilpa R, Lindsey ML. Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences. *J Mol Cell Cardiol* 48: 558–563, 2010.
- Zhang M, Kass DA. Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies. *Trends Pharmacol Sci* 32: 360–365, 2011.
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68: 106–114, 2000.
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12: 452–458, 2006.