

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

**Die Rolle des Protein-Phosphatase-1-Inhibitor-1 in der β -adrenergen
Signalkaskade kardialer Fibroblasten**

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

vorgelegt von

Sebastian Ewens

aus

Duderstadt

Göttingen 2018

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

Referent: Prof. Dr. med. A. El-Armouche

Ko-Referent: Prof. Dr. med. K. Toischer

Datum der mündlichen Prüfung: 04.04.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Rolle des Protein-Phosphatase-1-Inhibitor-1 in der β -adrenergen Signalkaskade kardialer Fibroblasten“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Klinik der Herzinsuffizienz.....	2
1.3	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1	6
1.4	β -adrenerge Signalkaskade	11
1.4.1	β -adrenerge Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz.....	13
1.5	Kardiale Fibroblasten.....	15
1.5.1	Myofibroblasten	18
1.5.2	Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung.....	19
1.6	Kardiales <i>Remodeling</i>	20
1.6.1	Fibroblasten und Myofibroblasten im kardialen <i>Remodeling</i>	21
1.7	Kardiale Fibrose.....	22
1.8	Antifibrotische Effekte von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP)	25
1.9	Zielsetzung	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Zellbiologische Methoden	28
2.1.1	Zellpräparation neonataler Rattenfibroblasten und -kardiomyozyten	28
2.1.1.1	Organentnahme und Ventrikelseparation	28
2.1.1.2	Enzymatischer Gewebeverdau	28
2.1.2	Zellpräparation neonataler Mausfibroblasten und -kardiomyozyten.....	31
2.1.3	Separation von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus neonatalen Mäusen und Ratten via <i>Pre-Plating</i>	32
2.1.4	Zellpassagierung neonataler Maus- und Rattenfibroblasten.....	32
2.1.5	Aktivierung cGMP-abhängiger Signalkaskaden mittels atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und Nitroprussid-Natrium (SNP)	33
2.1.6	Aktivierung cAMP-abhängiger Signalkaskaden mittels Isoprenalin	33
2.1.7	Selektive Blockade der β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Subtypen.....	34
2.1.8	Adenovirale Transduktion	34
2.2	RNA-Analytik	35
2.2.1	Isolation von RNA	35

2.2.2	Reverse Transkription.....	36
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
2.2.4	Quantitative Echtzeit-PCR	38
2.2.5	Gelelektrophorese.....	39
2.3	Proteinanalytik	40
2.3.1	Proteinisolation aus adhärenenten Zellen.....	40
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	40
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.3.4	Immunoblot	43
2.4	Immunfluoreszenzfärbung	44
2.5	Fluoreszenzmarkierte Durchflusszytometrie	45
2.6	Statistische Auswertung.....	47
2.7	Medien, Puffer und Lösungen	48
2.7.1	Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	48
2.7.2	Medien, Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	49
2.7.3	Medien, Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	51
2.7.4	Puffer für die Probenvorbereitung zur Durchflusszytometrie.....	53
2.8	Material	53
2.8.1	Antikörper	53
2.8.2	Primer, cDNA-Synthese und PCR-Programme	54
2.8.3	Substanzen.....	58
2.8.4	Hilfsmittel und Geräte	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Proteinanalytische Untersuchung zur Anreicherung isolierter kardialer Primärzellen aus neonataler Maus und Ratte	62
3.2	Expression des endogenen Inhibitor-1 in kardialen Zellpopulationen aus neonatalen Mäusen und Ratten.....	64
3.2.1	Expression des endogenen Inhibitor-1 in kardialen Zellpopulationen der adulten Maus	65
3.3	Überprüfung der Zellkulturbedingungen nach Serumentzug.....	67
3.4	Effekte chronischer β -adrenerger-Stimulation auf neonatale Rattenfibroblasten.....	69

3.5	Funktionelle Charakterisierung des Inhibitor-1 in Fibroblasten	73
3.5.1	Adenovirale Überexpression von Inhibitor-1 und seiner konstitutiv aktiven Mutante I-1c.....	73
3.5.1.1	Charakterisierung einer für neonatale Rattenfibroblasten geeigneten <i>Multiplicity of Infection</i>	74
3.5.1.2	Proteinanalytische Verifizierung der Protein-Überexpression von Inhibitor-1 und seiner konstitutiv aktiven Mutante	76
3.5.2	Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Inhibitor-1 in Fibroblasten durch chronische β -adrenerge Stimulation.....	78
3.5.3	Charakterisierung des Inhibitor-1-aktivierenden β -Adrenozeptor-Subtyps in Fibroblasten	80
3.5.4	Auswirkungen des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf kardiale Fibrose	82
3.5.5	Durch konstitutiv aktiven Inhibitor-1 induzierte Stressfaser-Bildung	84
3.5.6	Einfluss des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese....	87
3.5.6.1	Proteinanalytische Untersuchung zum Einfluss des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese	87
3.5.6.2	Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese	89
3.6	Phosphorylierung von Regulatorproteinen wachstumsassoziierter Signaltransduktionswege durch konstitutiv aktiven Inhibitor-1	91
4	Diskussion.....	94
4.1	Grundlegende Etablierungen	94
4.2	Effekte β -adrenerger Stimulation auf kardiale Fibroblasten	97
4.2.1	Isoprenalin-induzierte Effekte auf die Myofibroblasten- Transdifferenzierung	97
4.3	Inhibitor-1 in kardialen Fibroblasten	99
5	Zusammenfassung	105
6	Anhang	107
6.1	Abkürzungsverzeichnis	107
7	Literaturverzeichnis.....	113

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

In den Industrienationen sind etwa 1-2% der erwachsenen Bevölkerung von einer Herzinsuffizienz betroffen. Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung sind altersabhängig und mit zunehmendem Lebensalter signifikant steigend (Ponikowski et al. 2016). Somit gehört die Herzinsuffizienz zu den häufigsten internistischen Krankheitsbildern weltweit. Allein in der Bundesrepublik Deutschland wurden im Jahr 2016 455.680 Patienten aufgrund der Diagnose Herzinsuffizienz vollstationär behandelt, demzufolge stellt sie den häufigsten Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt dar (Statistisches Bundesamt 2018). Die Herzinsuffizienz geht mit einer insgesamt schlechten Prognose einher. Etwa 60% der Betroffenen versterben binnen 5 Jahren nach Diagnosestellung. Damit besitzt die Erkrankung eine ähnlich hohe Mortalität wie Malignomerkrankungen (5-JÜR ca. 50%) (McMurray und Stewart 2000). Die hohe Sterblichkeit spiegelt sich in der Todesursachenstatistik wider. Mit einem Anteil von 5,1% aller im Jahre 2015 Verstorbenen stellt die Herzinsuffizienz die dritthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar. Lediglich der akute Myokardinfarkt (5,3% aller Verstorbenen) und die chronische ischämische Herzkrankheit (8,2% aller Verstorbenen) sind häufigere Todesursachen (Statistisches Bundesamt 2018 a). Auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive ist die Herzinsuffizienz eine bedeutsame Erkrankung. Insgesamt können die durch Herzinsuffizienz verursachten Krankheitskosten für das Jahr 2015 mit einer Summe von etwa 5,28 Milliarden Euro beziffert werden. Bezogen auf die gesamten Gesundheitsausgaben von ca. 338,2 Milliarden Euro im selben Jahr macht dieses einen Anteil von ca. 1,6% aller Gesundheitsausgaben aus (Statistisches Bundesamt 2018 b). Betrachtet man diese bemerkenswerten Daten und die derzeitige demographische Entwicklung hin zu einer immer älter werdenden Bevölkerung, so zeigt sich ein Krankheitsbild mit drastischen Auswirkungen sowohl auf das Individuum als auch auf die Gesellschaft. Daher besteht weiterhin Handlungsbedarf hinsichtlich der Entwicklung von Präventionsstrategien und der Etablierung neuer Therapieoptionen.

1.2 Klinik der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz wird definiert als Abnormalität in der kardialen Struktur oder Funktion, welche zum Unvermögen des Herzens führt, periphere Gewebe adäquat mit Blut und Sauerstoff zu versorgen (Dickstein et al. 2008). Es handelt sich nicht um ein eigenständiges Krankheitsbild, vielmehr beschreibt die Herzinsuffizienz ein klinisches Syndrom, in welches eine Vielzahl von Erkrankungen münden kann. So können beispielsweise koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertension, Herzklappenfehler, Kardiomyopathien oder weitere Pathologien ursächlich für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz sein. In den westlichen Industrienationen stellen jedoch koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie oder deren Kombination die häufigsten Ursachen dar (Lip et al. 2000). Die typischen klinischen Manifestationen äußern sich in Form von Leistungsminderung, Dyspnoe, pectanginösen Beschwerden, Rhythmusstörungen und der Ausbildung von Ödemen in Folge von Flüssigkeitsretention. Das Auftreten dieser Symptome ist hinsichtlich der Prognose relevant und findet im Klassifikationssystem der New York Heart Association (NYHA) Verwendung. Je nach Ausprägung können die Symptome fehlen (NYHA I), bei starker körperlicher Belastung (NYHA II), bei geringer körperlicher Belastung (NYHA III) oder in Ruhe (NYHA IV) auftreten (Hoppe et al. 2005). Neben dieser Klassifikation existieren weitere Klassifikationssysteme. Zu den wichtigsten gehören die Einteilungen nach der primär insuffizienten Herzkammer (Linksherz-, Rechtsherzinsuffizienz, globale Herzinsuffizienz), nach dem Entwicklungszeitraum der Symptome (chronische Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz) und nach der Ursache der funktionellen Störung in Bezug auf die Ejektionsfraktion (systolische Herzinsuffizienz, diastolische Herzinsuffizienz) (Dickstein et al. 2008).

Der Ausgangspunkt für die Entstehung der Herzinsuffizienz liegt in einer Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion, bedingt durch eine myokardiale Schädigung unterschiedlichster Genese (s. o.). Dieses führt zu einer Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme und Transmitter, welche letztlich darauf abzielen, den kardialen Auswurf und den Blutdruck aufrechtzuerhalten (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Chronische, neurohumorale Aktivierung hingegen kann das kardiale Gewebe nachhaltig verändern (Kardiales *Remodeling*, siehe Kap. 1.6) und zu einer Progredienz der Herzinsuffizienz führen (Nationale

Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz 2017). Pathophysiologisch spielt hierbei das sympathische Nervensystem mit seinen Transmittern Adrenalin und Noradrenalin eine zentrale Rolle. Die freigesetzten Katecholamine stimulieren das Herz, führen zur Ausschöpfung der kardialen Reserve, steigern die kardiale Auswurfleistung und erhalten so initial den Kreislauf aufrecht. Chronisch erhöhte Katecholaminspiegel wirken sich hingegen nachteilig auf den Organismus aus. Langfristige Katecholamin-Stimulation führt über Erhöhung der Nachlast, gesteigerten Sauerstoffverbrauch am Myokard und über hypertrophe sowie apoptotische Stimuli auf die Kardiomyozyten (KM) selbst zur Verschlechterung der Herzfunktion (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist in diesem Kontext von pathophysiologischer Bedeutung. Während das aktivierte RAAS zunächst eine Steigerung der renalen Natrium- und Flüssigkeitsretention bedingt und über Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens die kardiale Füllung in der Diastole erleichtert, so kann die anhaltende Aktivierung dieses System die Ausbildung von Ödemen und eine Nachlasterhöhung begünstigen (Francis und Tang 2003, Shearer et al. 2013). Die chronische Aktivierung dieser neurohumoralen Systeme mündet somit in einen pathophysiologischen *circulus vitiosus*, welcher die Herzfunktion im Verlauf reduziert und die Klinik des Patienten verschlechtert.

Demgegenüber nehmen natriuretische Peptide die Funktion eines Gegenspielers ein. Sie können RAAS-vermittelte Effekte über Vasodilatation und gesteigerte Natriuresis (partiell) antagonisieren (Chen und Burnett Jr 2006, de Sa und Chen 2008), üben inhibitorischen Einfluss auf das sympathische Nervensystem aus (Brunner-La Rocca et al. 2001), wirken anti-proliferativ (D'Souza et al. 2003, Schirger et al. 2000), anti-inflammatorisch (Kiemer et al. 2002) und anti-ischämisch (D'Souza et al. 2003).

Bisherige pharmakotherapeutische Ansätze versuchen eben diesen Teufelskreis zu durchbrechen. Die in den letzten Jahrzehnten erfolgreich etablierten Herzinsuffizienz-Therapeutika beruhen auf der Blockade der neurohumoralen Systeme (Dewenter et al. 2014). So gehören ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker, β -Blocker und Aldosteronantagonisten zu den prognoseverbessernden (z.

B. SOLVD-Studie 1991 und 1992, CIBIS-II-Studie 1999, MERIT-HF-Studie 1999) und leitlinienempfohlenen Therapeutika. Daneben finden Diuretika und Herzglykoside als symptomverbessernde Pharmaka Anwendung in der Standardtherapie. Die Auswahl der Substanzklassen richtet sich nach der klinischen Manifestation und ist in Form einer Stufentherapie entsprechend den NYHA-Klassen gegliedert (Hoppe et al. 2005). Ergänzend zur Pharmakotherapie können je nach Schweregrad der Herzinsuffizienz apparative und chirurgische Maßnahmen wie die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT), die Implantation eines Kardioverter-Defibrillator (ICD), die Implantation eines CRT-D-Systems (Kombination auf CRT und ICD) oder, als *ultima ratio*, die Herztransplantation erwogen werden (Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz 2017).

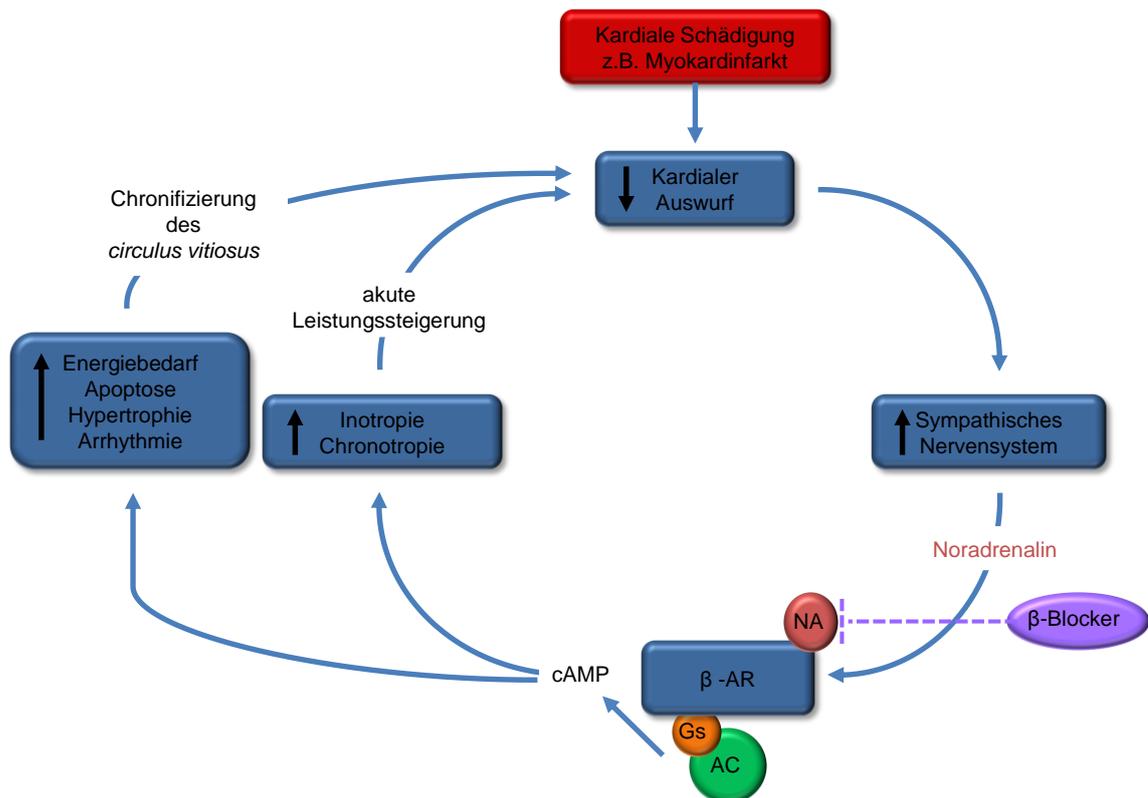


Abb. 1: Klinik der Herzinsuffizienz. *Circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz. Die Reduktion des kardialen Auswurfs durch eine Schädigung des Herzens (z. B. Myokardinfarkt) führt zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Die Freisetzung von Noradrenalin (NA) steigert die kardiale Kontraktionskraft und erhöht die Herzfrequenz, worüber in der Akutsituation die Organperfusion zunächst aufrechterhalten werden kann. Anhaltende sympathische Stimulation hingegen wirkt sich nachteilig auf den Organismus aus. Sie steigert den zellulären Energiebedarf, führt zur Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten, induziert kardiale Fibrose und kann Arrhythmien begünstigen. Diese Veränderungen bewirken wiederum eine weitere Verschlechterung der Herzfunktion bzw. Reduktion des kardialen Auswurfs und münden so in einen *circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz. Die Effekte von Noradrenalin werden im Herzen über β -Adrenozeptoren (β -AR), stimulierende G-Proteine (Gs), die Adenylcyclase (AC) sowie den *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt. β -AR-Antagonisten (β -Blocker) sind ein Therapieansatz in der Herzinsuffizienz, um das Voranschreiten des *circulus vitiosus* zu verhindern. Erstellt nach: Eschenhagen 2008. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

1.3 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1

Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) wurde erstmalig 1976 von Huang und Glinsmann aus Skelettmuskeln des Kaninchens isoliert und in der Literatur als erstes endogenes Protein mit Phosphatasen-regulierender Aktivität beschrieben. I-1 ist ein hitze- und säurestabiles Protein geringer Größe und wird im Zytosol verschiedener Säugetiergewebe exprimiert (Herzig und Neumann 2000). Das Protein besteht aus 171 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa (Elbrecht et al. 1990). Nach Auftrennung in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lässt sich I-1 jedoch bei einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa erfassen. Dieser Unterschied kann am ehesten über eine geringe Bindungsaffinität gegenüber den verwendeten Detergenzien erklärt werden (Endo et al. 1996). I-1 wird im Herzen nur schwach exprimiert, weshalb sich die immunologische Detektion des endogenen I-1 als schwierig gestaltet. Unter Verwendung des Trichloressigsäure-Extraktionsprotokolls nach Foulkes *et al.* aus dem Jahre 1980 ist eine Quantifizierung des Proteingehalts jedoch möglich (Wittkopper et al. 2011).

Funktionell betrachtet stellt I-1 einen spezifischen und potenten Inhibitor der Protein-Phosphatase-1 (PP-1) dar. Die Inhibition erfolgt jedoch erst nach Phosphorylierung am N-terminalen Threonin 35 (Thr35) durch die Proteinkinase A (PKA, $IC_{50} \sim 1$ nM), welche den I-1 in seine inhibitorisch-aktive Form überführt (Endo et al. 1996). Die Bindung von I-1 an die PP-1 findet demgegenüber unabhängig von der Phosphorylierung über ein am N-Terminus von I-1 lokalisiertes Bindungsmotiv (9 KIQF 12) statt (Egloff et al. 1997, Endo et al. 1996). Neben der Aktivierung ist die Deaktivierung von Phosphatase-Inhibitoren durch Dephosphorylierung ein wichtiger Prozess, um ein Überschießen ihrer Aktivität zu verhindern. So konnten zwei Ca^{2+} -abhängige Phosphatasen, PP-2B (Calcineurin) und PP-2A, identifiziert werden, welche die I-1-Aktivität durch Dephosphorylierung von Thr35 verringern. El-Armouche *et al.* konnten 2006 belegen, dass die Blockade von Calcineurin durch Cyclosporin A bzw. die Blockade der PP-2A durch Okadasäure eine erhöhte I-1-Phosphorylierung an Thr35 und von Phospholamban (PLB), einem Substrat von I-1, in isolierten Kardiomyozyten induziert.

Neben Thr35 existieren zwei weitere Phosphorylierungsstellen, Serin 67 (Ser67) (Braz et al. 2004, Sahin et al. 2006) und Threonin 75 (Thr75) (Rodriguez et al. 2006), welche PKA-unabhängig durch die Proteinkinase $C\alpha$ (PKC α , Isoform der PKC-Familie) phosphoryliert werden. Rodriguez *et al.* haben 2007 gezeigt, dass die Phosphorylierung von Ser67 und/oder Thr75, im Gegensatz zur Phosphorylierung von Thr35, zur Reduktion der I-1-Aktivität führt. Somit scheint sowohl Ca^{2+} als auch PKC α die Funktion eines Gegenspielers zur PKA hinsichtlich der I-1-Regulation einzunehmen. Durch Verkürzung der Aminosäuresequenz auf 65 Aminosäuren und einen Basenaustausch von Threonin 35 gegen Aspartat (T35D) ließ sich eine unabhängig vom Phosphorylierungszustand konstitutiv aktive Mutante (I-1c) generieren (Endo et al. 1996, Wittköpper 2009).

Die Rolle von I-1 wurde nach seiner erstmaligen Beschreibung in verschiedenen Geweben untersucht, wobei sich Analysen hinsichtlich der Funktion zunächst auf den Glykogenstoffwechsel in Skelettmuskelzellen konzentrierten. Dabei wurde I-1 der Erhalt der Phosphorylierung und somit die Inaktivierung der Glykogensynthase, einem Schlüsselenzym der Glykogen-Synthese, zugeschrieben (Nakielny et al. 1991). In weiteren Experimenten wurde beobachtet, dass die insulinabhängige Aktivierung von Phosphodiesterasen zur Abnahme der I-1-Aktivität und folglich zur Dephosphorylierung der Glykogensynthase führt (Foulkes et al. 1980). Im Jahre 1999 wurden diese Beobachtungen allerdings durch Versuche in einem I-1/DARPP-32 (Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa)-*knock out* (KO)-Mausmodell widerlegt. DARPP-32 ist ein vorwiegend neuronal exprimiertes Phosphoprotein, welches viele physikochemische Eigenschaften von I-1 aufweist (z. B. Hitze- und Säurestabilität, niedriges Molekulargewicht) (Hemmings et al. 1984 b) und ebenfalls einen potenten Inhibitor der PP-1 darstellt (Hemmings et al. 1984 a). Neben einem gemeinsamen PP-1-Bindungsmotiv (KIQF) und einer Phosphorylierungsstelle an Thr35 findet sich am N-Terminus eine zu I-1 homologe Aminosäuresequenz von 40 Aminosäuren (Greengard et al. 1999, Williams et al. 1986).

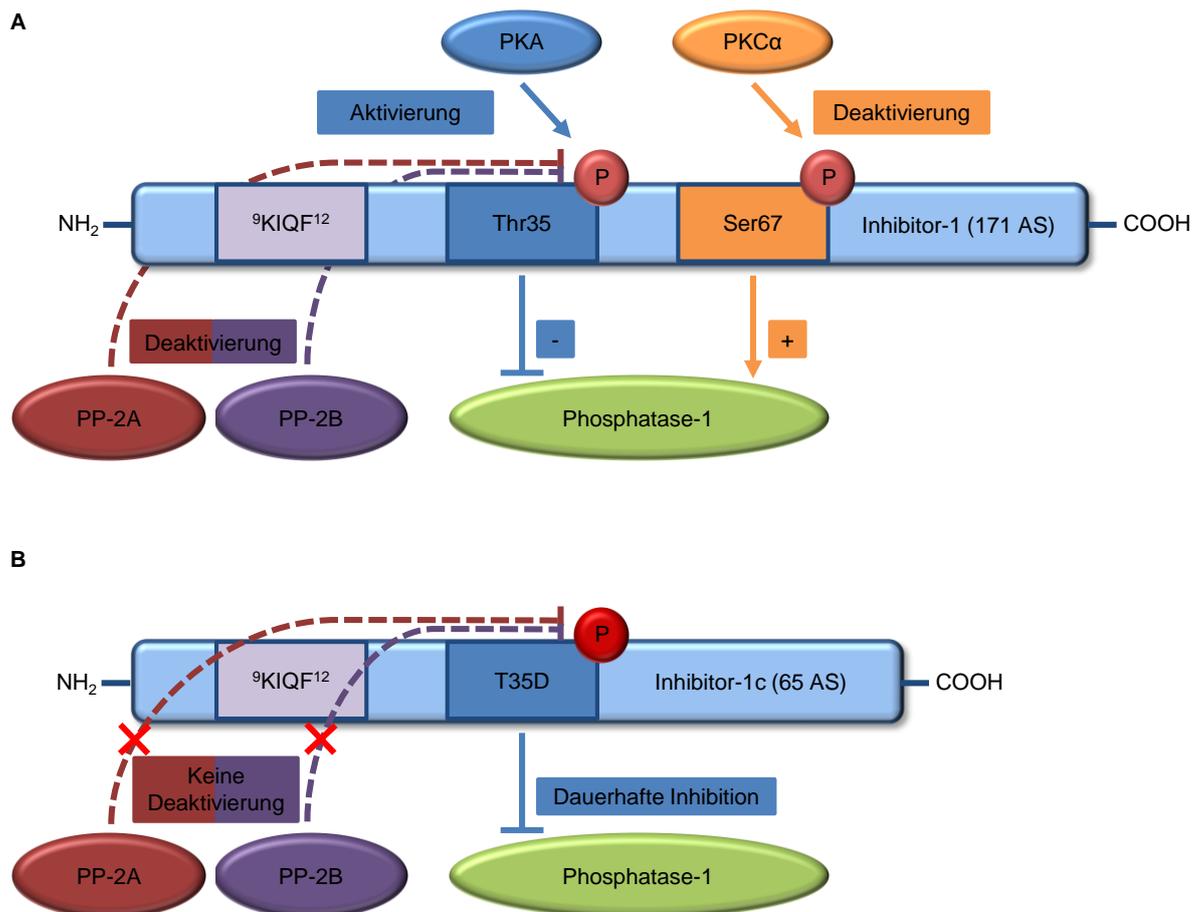


Abb. 2: Protein-Phosphatase-Inhibitor-1. (A) Struktur, Regulation und Funktion von Inhibitor-1. Der aus 171 Aminosäuren bestehende Inhibitor-1 (I-1) besitzt am N-Terminus ein für die Bindung der Phosphatase-1 (PP-1) spezifisches Bindungsmotiv (⁹KIQF¹²). Phosphorylierung (P) von I-1 an Threonin 35 (Thr35) führt über seine Aktivierung zur selektiven Inhibition der PP-1. Der inhibitorische Effekt von I-1 auf PP-1 wird durch Phosphorylierung an Serin 67 (Ser67) durch die Proteinkinase C α (PKC α) vermindert. Dephosphorylierung von I-1 (Thr35-P) durch die Ca²⁺-abhängigen Phosphatasen Calcineurin (PP-2B) und Proteinphosphatase 2A (PP-2A) inaktiviert I-1. (B) Struktur, Regulation und Funktion der konstitutiv aktiven Mutante Inhibitor-1c (I-1c). Bedingt durch einen Basenaustausch (Threonin 35 gegen Aspartat, T35D) und Verkürzung der Aminosäuresequenz (65 AS) befindet sich I-1c unabhängig vom Phosphorylierungszustand in einer dauerhaft aktiven Form. Erstellt nach: Wittkopper et al. 2011. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press.

Untersuchungen zur Funktion des I-1 im Gehirn ergaben, dass aktivierter I-1 die Autophosphorylierung der Calcium- und Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), eines Hauptmediators der Ca²⁺-abhängigen Langzeit-Potenzierung (LTP), einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung, in hippocampalen Arealen verlängert und so an der LTP beteiligt ist (Blitzer et al. 1998, Brown et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde von Allen *et al.* (2000) eine Abnahme in der LTP in I-1-KO-Mäusen beobachtet, weshalb anzunehmen ist, dass I-1 die neuronale Plastizität und somit den Lernprozess beeinflusst. Ebenso

scheint I-1 den Zellzyklus und das Zellwachstum zu beeinflussen. In Oozyten des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*), welche nicht der G1-Phase des Zellzyklus unterliegen, zeigte sich, dass I-1 die Zellteilung und die Oozytenreifung hemmt (Huchon et al. 1981). Darüber hinaus aktiviert I-1 den Mitose-induzierenden *maturation promoting factor* (MPF) und reduziert die Aktivität der Histon-H1-Phosphatase (Walker et al. 1992).

Die Rolle von I-1 im Herzen wurde nach seiner Erstbeschreibung (s. o.) anfangs wenig hinterfragt. Obwohl sich in den letzten Jahren wissenschaftliches Interesse hinsichtlich der kardialen Funktion entwickelte, existierten noch immer viele Unklarheiten. Die Expression von I-1 in kardialem Gewebe wurde erstmalig in Meerschweinchenventrikeln und in Rattenherzen beschrieben (Ahmad et al. 1989, Iyer et al. 1988). Später wurde I-1 auch in isolierten Kardiomyozyten detektiert (Gupta et al. 1996). Erste Hinweise auf einen kardialen Einfluss von I-1 ergaben sich durch die Beobachtung, dass I-1 im Herzen einer hormonellen Regulation durch Katecholamine unterliegt und Stimulation mit Isoprenalin zur Phosphorylierung von I-1 und zur Abnahme der PP-1-Aktivität führt (Gupta et al. 1996, Iyer et al. 1988, Neumann et al. 1991). Diese Annahme wurde 2002 von Carr *et al.* durch ein I-1-KO-Mausmodell gestützt. I-1-KO-Mäuse wiesen eine verminderte Reaktion auf β -adrenerge Stimuli, eine gesteigerte PP-1-Aktivität und eine verminderte Phosphorylierung von PLB auf, während die Phosphorylierung des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals (LTCC) und von Troponin I (TnI) keiner Beeinflussung unterlag (Carr et al. 2002). Auch Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen einen relevanten kardialen Einfluss von I-1. Die adenovirale Überexpression von I-1 in Rattenkardiomyozyten und in *engineered heart muscle* (EHM) führt unter Isoprenalin-Stimulation zur gesteigerten Kontraktilität in Verbindung mit herabgesetzter PP-1 Aktivität (El-Armouche et al. 2003 a).

Weitere Evidenz über die Funktion von I-1 als β -adrenerges Verstärkerelement lieferte ein transgenes (TG) Mausmodell unserer Arbeitsgruppe mit herzspezifischer I-1-Überexpression. Verglichen mit Wildtyp (WT)-Mäusen zeigten TG-Tiere nach chronisch adrenergem Stress eine verstärkte Herzhypertrophie sowie kontraktile Dysfunktion und wiesen *ex vivo* eine dreifach erhöhte PLB-

Phosphorylierung auf. Demgegenüber waren I-1-KO-Mäuse partiell vor der Entwicklung ventrikulärer Arrhythmien nach akutem β -adrenergem Stress und vor Myokardfibrose, Herzhypertrophie/-dilatation und β -adrenerger Desensitivierung nach chronischem β -adrenergem Stress geschützt (El-Armouche et al. 2008).

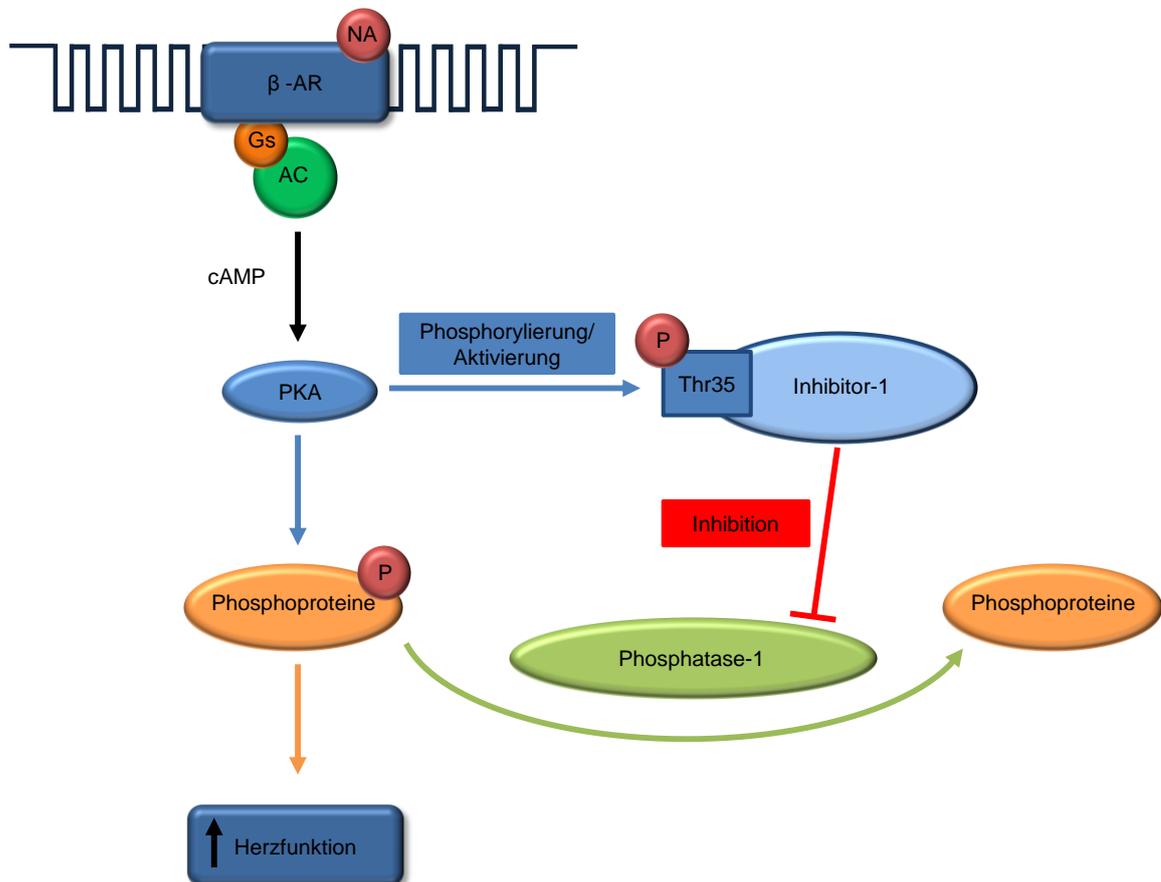


Abb. 3: Protein-Phosphatase-Inhibitor-1. Funktion von I-1 im Herzen. Inhibitor-1 ist ein distales Element innerhalb der β -adrenergen Signalkaskade. Seine Aktivierung erfolgt über die PKA-abhängige Phosphorylierung an Thr35. Über die Hemmung der Phosphatase-1 verstärkt I-1 β -adrenerge Effekte im Herzen. **Abkürzungen:** Noradrenalin (NA); G_s -Protein (G_s); Adenylcyclase (AC); Proteinkinase A (PKA); Threonin 35 (Thr35); Phosphatgruppe (P). Erstellt nach: Wittkopper et al. 2011. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press.

Neben den tierexperimentellen Daten untermauern Expressionsanalysen in humanen insuffizienten Herzen die Relevanz von I-1 in der Herzinsuffizienz. Im Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz war die I-1-Expression um 58% und die I-1-Phosphorylierung sogar um 77% reduziert. Diese Daten lassen darauf schließen, dass chronisch erhöhte Katecholaminspiegel in der Herzinsuffizienz die Genexpression von I-1 verringern und PKA-abhängige Phosphorylierungen vermindern (El-Armouche et al. 2004).

1.4 β -adrenerge Signalkaskade

Das gesunde Herz ist im Stande, unter Belastung den kardialen Auswurf binnen Sekunden um ein etwa Fünffaches zu steigern. Diese bemerkenswerte Anpassungsreaktion wird in erster Linie durch das sympathische Nervensystem über die Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin bedingt. Die sympathischen Effektorhormone üben ihren kardialen Einfluss hauptsächlich über die β -adrenerge Signalkaskade aus (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Kardiomyozyten exprimieren drei Subtypen von β -Adrenozeptoren (β -AR), wobei β_1 -AR und β_2 -AR die häufigsten Subtypen darstellen (Brodde et al. 2006, Brodde und Michel 1999, Kang et al. 2007, Lohse et al. 2003, Port und Bristow 2001, Rockman et al. 2002, Xiang und Kobilka 2003). β_1 -AR sind die quantitativ am stärksten exprimierten Subtypen des gesunden Herzens (ca. 70-80%) (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Lohse et al. 2003). Ihre Aktivierung übt einen starken Einfluss auf die Pathophysiologie von Kardiomyozyten aus (Brodde und Michel 1999). Die Stimulation durch Katecholamine erhöht die Kontraktilität des Myokards, die Herzfrequenz, die Überleitungsgeschwindigkeit am Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) sowie die diastolische Relaxation. β_2 -AR werden interessanterweise in Kardiomyozyten der Ratte nur schwach exprimiert, verglichen mit ihrer hohen Gesamtexpression innerhalb des gesamten Rattenventrikels (Buxton und Brunton 1985). Dieses deutet auf eine hohe β_2 -AR-Expression in Nicht-Kardiomyozyten hin. Gustafsson und Brunton haben 2000 mittels Echtzeit-PCR-Analysen belegt, dass β_2 -AR den prädominanten Rezeptorsubtypen in kardialen Fibroblasten bilden. Selektive β_2 -AR-Blockade und anschließende Stimulation mittels Isoprenalin reduziert die Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in kardialen Fibroblasten um etwa 90%, woraus sich schlussfolgern lässt, dass β -adrenerge Effekte in diesem Zelltyp vornehmlich über β_2 -AR mediiert werden (Gustafsson und Brunton 2000). Dieses Ergebnis wurde 2003 von Turner *et al.* untermauert, ihre RT-PCR-Daten zeigten die ausschließliche Expression von β_2 -AR. Über den kardialen β_3 -AR ist hingegen wenig bekannt (Brodde et al. 2006). Einige Daten aus herzspezifischen Überexpressionsanalysen in Mäusen deuten auf einen kontraktilitätssteigernden Einfluss hin (Kohout et al. 2001), während andere Daten aus β_1 -/ β_2 -AR-KO-Mausmodellen nur geringe oder keine Effekte auf die Herzfunktion zeigten (Devic et al. 2001, Heubach et al. 2002, Tavernier et al. 1992). Der vermeintlich

identifizierte β_4 -AR-Subtyp scheint letztlich durch eine modifizierte Form des β_1 -AR-Subtyps gebildet zu werden (Granneman 2001).

β_1 -AR stellen klassische G_s -gekoppelte Rezeptoren dar. Ihre Stimulation führt über die Aktivierung von Adenylylcyclasen (AC) (Defer et al. 2000) zur Steigerung der Synthese des *second messengers* cAMP. Die PKA wird durch cAMP aktiviert. In ihrer aktiven Form phosphoryliert PKA eine Reihe von regulatorischen Schlüsselproteinen, welche die Herzfunktion wesentlich beeinflussen (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Lohse et al. 2003). Zu ihnen gehören der LTCC (Gerhardstein et al. 1999, Zhao et al. 1994), der sarkoplasmatische Ryanodinrezeptor (RyR2) (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Marx et al. 2000), PLB (Simmerman und Jones 1998), Tnl (Sulakhe und Vo 1995), Myosin-bindendes Protein C (MyBP-C) (Kunst et al. 2000) und Phospholemman (PLM) (Despa et al. 2005). Die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) wird durch PLB, ihren Hauptregulator, im nicht-phosphorylierten Zustand inhibiert. Diese Inhibition entfällt nach Phosphorylierung von PLB, worüber eine gesteigerte Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) erzielt wird. Dieses fördert die Relaxation (positive Lusitropie) und bewirkt letztlich über eine vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Systole, eine Steigerung der myokardialen Kontraktionsfähigkeit (positive Inotropie) (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Luo et al. 1994, MacLennan und Kranias 2003, Simmerman und Jones 1998). Positive Inotropie wird ebenso über Phosphorylierung des LTCC (vermehrter extrazellulärer Ca^{2+} -Einstrom) und des RyR2 (gesteigerter Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR) erzielt (Bers 2002, Bers 2008, Rapundalo 1998). Daneben ist cAMP Ligand der HCN-Kationenkanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*), welche als „Schrittmacherkanäle“ die positiv chronotrope Wirkung des β -adrenergen Systems mediiieren (Biel et al. 2002). Im Gegensatz zu β_1 -AR kann der β_2 -AR-Subtyp sowohl in G_s -Protein-gekoppelter als auch in G_i -Protein-gekoppelter Form vorliegen (Xiao et al. 1995). Der β_2 -AR- G_i -Signalweg wirkt inhibitorisch auf die Aktivität der AC und der cAMP-Synthese sowie auf die Aktivierung der PKA (Woo und Xiao 2012).

Der Einfluss des PKA/cAMP-Systems wird durch cAMP-degradierende Phosphodiesterasen (PDE) und Proteinphosphatasen gegenreguliert (Ceulemans und Bollen 2004, Cohen 2002, Herzig und Neumann 2000, Mansuy und Shenolikar 2006). Phosphatasen werden wiederum durch eine Vielzahl von Untereinheiten reguliert, eine dieser regulatorischen Untereinheiten ist der I-1. (Carr et al. 2002, El-Armouche et al. 2003 a, Neumann et al. 1991).

1.4.1 β -adrenerge Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz

Ein pathologisches Merkmal der Herzinsuffizienz ist die β -adrenerge Desensitivierung, die eine abgeschwächte kardiale Reaktion auf β -adrenerge Stimuli zur Folge hat (Dorn und Molkentin 2004, El-Armouche et al. 2003 b, Eschenhagen 2008, Lohse et al. 2003, Mann und Bristow 2005, Movsesian und Bristow 2005, Mudd und Kass 2008, Vatner et al. 2000) und positiv inotrope Effekte nach Katecholamin-Stimulation deutlich reduziert (Bohm et al. 1988, Colucci et al. 1988, Feldman et al. 1987). Verschiedene molekulare Veränderungen auf Rezeptor- und intrazellulärer Proteinebene tragen zur Desensitivierung bei. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz ist neben der Rezeptordichte des β_1 -AR-Subtyps auch die Expression der jeweiligen mRNA um bis zu 50% vermindert (Bristow et al. 1982, Engelhardt et al. 1996, Kiuchi et al. 1993). Interessanterweise scheinen β_2 -AR von der Herunterregulation weitestgehend ausgenommen zu sein, wobei noch unklar ist, warum sich die Reduktion der Rezeptordichte primär auf β_1 -AR bezieht (Lohse et al. 2003). Neben der quantitativen Rezeptorenreduktion wird ebenso die Funktionalität der exprimierten β_1 -AR negativ beeinflusst. β -AR-Phosphorylierung durch gesteigerte β -AR-Kinase-Aktivität (β -ARK) führt zur Entkopplung der Rezeptoren von ihren G_s -Untereinheiten (Ungerer et al. 1993), welches eine Verminderung der Rezeptoraktivität um bis zu 70% bedingen kann (Lohse et al. 1992, Lohse et al. 1990).

Die Desensitivierung wirkt sich auf den Phosphorylierungszustand der PKA-Substrate aus. Verglichen mit dem gesunden Herzen sind TnI, PLB und das kardiale MyBP-C in der Herzinsuffizienz hypophosphoryliert (Bartel et al. 1996, Bodor et al. 1997, El-Armouche et al. 2007, Messer et al. 2007) und die Expression so-

wie die Phosphorylierung von zytosolischem I-1 signifikant vermindert (El-Armouche et al. 2004, El-Armouche et al. 2003 a) (siehe Kap. 1.3). Die in der Herzinsuffizienz erhöhte Aktivität der PP-1, einer PLB-dephosphorylierenden Phosphatase (MacDougall et al. 1991), könnte somit Folge der reduzierten I-1 Funktion sein (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Neumann et al. 1997). Erstaunlicherweise sind in diesem Kontext nicht sämtliche PKA-Substrate hypophosphoryliert. Ausnahmen bilden der RyR2 (zeigt sich hyperphosphoryliert im insuffizienten Herzen) (Marx et al. 2000) sowie der LTCC (zeigt sich aktivitäts-gesteigert im insuffizienten Herzen, welches auf Hyperphosphorylierung schließen lässt) (Schroder et al. 1998). Hyperphosphorylierung dieser Proteine kann den sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Einstrom während der Systole erhöhen und zum frühdiastolischen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR führen und so einen Ausgangspunkt für ektope Erregungsbildungen und Arrhythmien bilden. (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Marx et al. 2000).

Ob β -adrenerge Desensitivierung als Fehlanpassung im Kontext der Herzinsuffizienz oder als protektive Anpassungsreaktion zu verstehen ist, ist letztlich nicht eindeutig geklärt (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Einige Daten deuten auf ein Überwiegen der protektiven Effekte hin (Eschenhagen 2008). Tiere einer Mauslinie, welche auf chronische Katecholamin-Stimulation mit Reduktion der β -AR-Dichte reagierten, entwickelten weniger ausgeprägte kardiale Hypertrophie und Myokardschädigung als die Kontrollgruppe (Faulx et al. 2005). In einer Kohorte afroamerikanischer Herzinsuffizienzpatienten mit einem *gain-of-function*-Polymorphismus der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 5 (GRK5), einem β -AR-entkoppelndem Enzym mit β -AR-desensitivierender Wirkung, konnte eine verlängerte Überlebenszeit / transplantatfreie Lebenszeit (*time to cardiac transplant*) (Liggett et al. 2008) beobachtet werden. Weiterhin existieren keine Daten über Tiermodelle, in welchen ein Zusammenhang zwischen verminderter Aktivität des β -adrenergen Signalweges und dem Entstehen pathologischer Herzveränderungen hergestellt werden konnte, während transgene, „ β -adrenerg überaktive“ Mäuse Herzinsuffizienz entwickelten (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Auch pharmakologische Studien untermauern diese These. Trotz β -AR-Desensitivierung führt der Einsatz von β -Blockern in der Herzinsuffizienz zur Reduktion der Sterb-

lichkeit (Bristow 2000, Packer 2001, Satwani et al. 2004), zur langfristigen Steigerung der Ejektionsfraktion (Hall et al. 1995) und zum reversen ventrikulären *Remodeling* (Loves et al. 2002, Mann und Bristow 2005, Mudd und Kass 2007), während der Einsatz von Katecholaminen hingegen die Sterblichkeit herzinsuffizienter Patienten erhöht (O'Connor et al. 1999).

1.5 Kardiale Fibroblasten

Das gesunde Säugetierherz wird aus insgesamt sechs verschiedenen Zelltypen gebildet, welche sich in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten gliedern. Etwa 75% des Myokards besteht aus Kardiomyozyten, wenngleich sie nur etwa 30-40% der Gesamtzellzahl des Herzens ausmachen (Vliegen et al. 1991). Mit etwa 60-70% der Gesamtzellzahl stellen Nicht-Kardiomyozyten den zellulären Hauptbestandteil des Herzens dar. Nicht-Kardiomyozyten untergliedern sich wiederum in (i) Fibroblasten (FB), (ii) Endothelzellen, (iii) glatte Muskelzellen, (iv) Perizyten und (v) Makrophagen (Nag 1980), wobei kardiale Fibroblasten (KFB) die insgesamt häufigste Zellpopulation des Herzens repräsentieren (Camelliti et al. 2005).

Bis etwa Ende der 1970er Jahre hat sich die kardiovaskuläre Forschung vornehmlich auf Kardiomyozyten konzentriert, während die Bedeutung der Nicht-Kardiomyozyten zunächst vernachlässigt wurde. Erst danach rückten kardiale Fibroblasten zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung und wurden als bedeutende Regulatoren der Herzfunktion erkannt (Daskalopoulos et al. 2012). Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und werden anhand morphologischer Charakteristika und/oder ihrer Proliferationsfähigkeit definiert, wobei sich die Charakteristika jedoch nach Gewebelokalisation (Lindner et al. 2012) und metabolischer Aktivität unterscheiden können. Morphologisch präsentieren sich Fibroblasten als flache, spindelförmige Zellen mit vielen zytoplasmatischen Zellausläufern, welche dem Zellkörper entspringen. Durch die Expression von Aktin- und Myosinfilamente sind Fibroblasten pleiomorphe und motile Zellen. Einwirkungen ihrer unmittelbaren Umgebungen, insbesondere mechanische Stimuli, beeinflussen den Aktin-/Myosin Gehalt und deren strukturelle Anordnung, wodurch sich Änderungen ihrer Morphe und ihrer Beweglichkeit ergeben (Camelliti et al. 2005).

Innerhalb ihres Zellkörpers befindet sich ein ovaler Nucleus, hohe Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum und ein ausgeprägter Golgi-Apparat. Im Gegensatz zu den übrigen kardialen Zellpopulationen (s. o.) fehlt Fibroblasten eine eigenständige Basalmembran, wodurch eine Abgrenzung gegenüber anderen Zelltypen des Herzens ermöglicht wird (Souders et al. 2009). Obwohl Fibroblasten in allen Regionen des Myokards vorzufinden sind, unterscheidet sich ihre Zelldichte nach ihrer Lokalisation. So ist die Zelldichte im Myokard der Vorhöfe oder der Ventrikel geringer als im Bereich um den Sinusknoten (Baum und Duffy 2011).

Fibroblasten üben eine Vielzahl an Funktionen aus, die sich abhängig vom jeweiligen umgebenden Gewebetyp und ihrer Lokalisation unterscheiden. Im Herzen bestehen ihre Hauptfunktionen aus (i) Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM), der Transduktion und Übertragung von (ii) mechanischen und (iii) elektrischen Stimuli sowie (iv) der Produktion biochemischer Botenstoffe (Camelliti et al. 2005, Souders et al. 2009). Kardiale Fibroblasten synthetisieren und degradieren die EZM, welche kardiale Zellen in ein dreidimensionales Netzwerk einbettet und so Struktur und Funktion des Herzens determiniert (Souders et al. 2009). Die EZM besteht hauptsächlich aus fibrillärem Kollagen Typ I (~85% im gesunden Herzen) und Typ III (~10% im gesunden Herzen) (Medugorac und Jacob 1983, Weber 1989), daneben stellen Proteoglykane, Glykoproteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Wasser weitere Bestandteile der EZM dar (Bowers et al. 2010, Corda et al. 2000, Holmes et al. 2005, Visconti und Markwald 2006). Kollagen Typ I besitzt eine hohe Zugfestigkeit und verleiht dem Myokard mechanische Stabilität und Steifigkeit (Brilla et al. 1995), während Kollagen Typ III ein feines retikuläres Netzwerk bildet, dehnbar ist und so zur Elastizität des Herzens beiträgt (Weber 1997). Die EZM verbindet kardiale Zellen zu einer funktionellen Einheit und überträgt chemische Signale, elektrische Signale und mechanische Kräfte innerhalb des Myokards (Bowers et al. 2010, Holmes et al. 2005, Manabe et al. 2002).

Kardiale Fibroblasten spielen eine zentrale Rolle innerhalb der mechanischen Kraft- und Signalübertragung. Während der normalen Herzfunktion sind sie mit jeder Kontraktion mechanischen Kräften ausgesetzt. Mechanische Stimuli werden

über unterschiedliche Mechanismen detektiert, wie beispielsweise über Integrine, Ionenkanäle und *second-messenger* (Camelliti et al. 2005). Dehnungsreize aktivieren intrazelluläre Signalwege und führen zur Steigerung der Proliferationsrate, zu einer vermehrten EZM-Synthese und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und EZM-zersetzende Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Camelliti et al. 2005, Ruwhof et al. 2000, van Wamel et al. 2001, Yokoyama et al. 1999). Die adäquate Sekretion dieser Mediatoren und Enzyme hält im gesunden Herzen die Balance zwischen Synthese und Abbau der EZM aufrecht. Demgegenüber resultieren Störungen dieses Gleichgewichtes entweder in einer überschießenden EZM-Produktion oder Degradation und führen zur Entwicklung von kardialen Pathologien, wie der Herzfibrose (Weber und Brilla 1991, Zannad et al. 2001) (siehe Kap. 1.7) oder dem kardialen *Remodeling* (Tao et al. 2004) (siehe Kap. 1.6). Obwohl kardiale Fibroblasten zu den nicht-erregbaren Zellen zählen und daher nicht im Stande sind, Aktionspotentiale zu generieren, so tragen sie dennoch zu den elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens bei (Kamkin et al. 2003, Kohl et al. 1992). Aufgrund der Expression von dehnungsaktivierten Ionenkanälen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} -Kanäle) (Hu und Sachs 1997) reagieren kardiale Fibroblasten auf mechanische Stimuli mit der Veränderung ihres Membranpotentials und üben so einen aktiven Einfluss auf die Herzelektrik aus (Kamkin et al. 2003). Daneben können Fibroblasten auch indirekt die Elektrophysiologie beeinflussen, indem sie als Isolatoren fungieren. Beispielsweise werden die Zellen des Sinusknotens vollständig von Arealen aus Fibroblasten umgeben und sind dadurch elektrisch isoliert (Baum und Duffy 2011). *In-vitro*-Daten zeigen, dass kardiale Fibroblasten und Kardiomyozyten über Zellverbindungen wie Connexine (z. B. Connexin 43) elektrisch gekoppelt sind (Gaudesius et al. 2003) und, dass elektrische Leitungsübertragung untereinander stattfinden kann (Chilton et al. 2007, Vasquez et al. 2011). Viele dieser Daten wurden jedoch in zweidimensionalen Ratten-Zellkulturen erhoben. Inwieweit eine Signalübertragung zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten im humanen Herz *in vivo* stattfindet, ist derzeit noch unklar (Ongstad und Gourdie 2012).

Eine weitere Funktion kardialer Fibroblasten liegt in der Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderer biochemischer Botenstoffe (s. o.),

welche einen Effekt auf alle kardialen Zelltypen ausüben können (Souders et al. 2009). Im Rahmen der Herzinsuffizienz können hohe Konzentrationen an zirkulierenden proinflammatorischen Interleukinen (z. B. IL-1 β , IL-6) und profibrotischen Zytokinen (z. B. *transforming growth factor- β* , TGF- β) detektiert werden. (Nian et al. 2004). Kardiale Fibroblasten stellen dabei den Hauptsyntheseort des Zytokins IL-1 β nach kardialer Schädigung dar (Long 2001).

1.5.1 Myofibroblasten

Myofibroblasten (MyoFB) sind kein Bestandteil des gesunden Myokards, sie differenzieren sich vor allem nach kardialer Schädigung (Baum und Duffy 2011). So kann ein erhöhtes Vorkommen von Myofibroblasten im kardialen Interstitium, z. B. nach Myokardinfarkten (Willems et al. 1994), bei druck- und/oder volumenbelasteten Herzen (Leslie et al. 1991, Wang et al. 2003) oder im Rahmen der alkoholischen Kardiomyopathie (Law et al. 2012) beobachtet werden (Kong et al. 2014). Der Ursprung der Myofibroblasten kann sich hinsichtlich seiner Vorläuferzellen unterscheiden. Ortsständige Fibroblasten, welche durch Stimuli (siehe Kap. 1.5.2) zur Transdifferenzierung angeregt werden, scheinen den häufigsten zellulären Ursprung darzustellen (Baum und Duffy 2011, Daskalopoulos et al. 2012, Hinz et al. 2007). Daneben können sie sich auch aus (i) Endothelzellen (Zeisberg et al. 2007), (ii) Epithelzellen (Potts und Runyan 1989), (iii) Fibrozyten (Strieter et al. 2009) und (iv) Perizyten (Diaz-Flores et al. 2009) differenzieren. Im Gegensatz zu Fibroblasten weisen Myofibroblasten eine sternenförmige Morphologie auf und enthalten zahlreiche exozytotische Vesikel und die für Myofibroblasten typischen Stressfasern sowie Mikrofilamentbündel (Baum und Duffy 2011, Kalluri und Zeisberg 2006, Tomasek et al. 2002). Diese Mikrofilamentbündel enden an der Zelloberfläche in spezialisierten Adhäsionskomplexen, den Fibronexus, welche als Bindeglied zwischen intrazellulären Mikrofilamenten und extrazellulärem Fibronectin fungieren und so die Kraftübertragung auf die umliegende EZM während der Zellkontraktion ermöglichen (Baum und Duffy 2011). Reife Myofibroblasten zeichnen sich durch die vermehrte Expression von Vimentin und durch die *De novo*-Expression von *α -smooth muscle actin* (α -SMA) aus. Diese beiden Proteine sind maßgeblich an der Bildung der Stressfasern innerhalb des

Zytoskeletts beteiligt und bewirken eine Erhöhung der zellulären Kontraktilität (Hinz et al. 2001 a, Kalluri und Zeisberg 2006, Wang et al. 2006).

Myofibroblasten üben eine Vielzahl von Funktionen aus. Es wurde gezeigt, dass sie eine Rolle in der Entwicklung, dem Wachstum und der Regeneration unterschiedlicher Gewebe spielen (Gabbiani 1996, Gabbiani 2003, Gabbiani et al. 1971). Aufgrund ihrer kontraktilen Proteine (s. o.) besitzen sie eine höhere Motilität gegenüber nicht differenzierten Fibroblasten und sind im Stande, sich zu kontrahieren, welches essentiell für Wundverschluss und Narbenheilung ist (Sun und Weber 2003). In der Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt produzieren Myofibroblasten entzündungs- und fibroseregulierende Faktoren und tragen über EZM-Sekretion und Kontraktion zur Stabilität des infarzierten Gewebes bei (Ma et al. 2014). Von fehlregulierten Myofibroblasten hingegen können jedoch für den Organismus nachteilige Effekte ausgehen, so können Störungen in der Apoptose ursächlich für die Ausbildung einer kardialen Fibrose sein (Souders et al. 2009).

1.5.2 Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung

Die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird im Herzen durch Schädigung des Myokards, z. B. durch Myokardinfarkt oder Hypertensive Herzerkrankung initiiert (Baum und Duffy 2011, Rohr 2009). Kardiale Fibroblasten werden dabei mechanisch über die Einwirkung veränderter Dehnungs- und Spannungsmuster sowie chemisch über Entzündungsmediatoren stimuliert, welches zur Transdifferenzierung führt. Die genauen molekularen Prozesse, die den Wechsel des Phänotyps und die Veränderung des zellulären Expressionsmusters verursachen, sind besonders *In vivo* derzeit nur wenig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung (Baum und Duffy 2011).

Nach myokardialer Schädigung differenzieren sich Fibroblasten zunächst zu Vorläuferzellen reifer Myofibroblasten, den Proto-Myofibroblasten (Baum und Duffy 2011, Hinz und Gabbiani 2003 b), wobei die verstärkte Einwirkung modulierter, mechanischer Kräfte durch die Gewebsverletzung den Hauptstimulus hierfür darstellt (Daskalopoulos et al. 2012, Tomasek et al. 2002). Im Gegensatz zu kardialen Fibroblasten weisen Proto-Myofibroblasten eine erhöhte Expression von

Fibronektin (Hinz et al. 2001 a, Hinz und Gabbiani 2003 a, Hinz et al. 2007) und von reifen fokalen Adhäsionen (Meran und Steadman 2011) als Charakteristika auf. Unter fortwährender mechanischer Krafteinwirkung und unter dem Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren differenzieren Proto-Myofibroblasten zu reifen Myofibroblasten (Baum und Duffy 2011, Daskalopoulos et al. 2012). Hierbei scheinen die profibrotischen Zytokine TGF- β , *connective tissue growth factor* (CTGF) sowie die Hormone Angiotensin II (AT II) und Endothelin (ET-1) die Transdifferenzierung (Leask 2010) zu begünstigen. Reife Myofibroblasten sind durch die *De novo*-Expression von α -SMA (s. o.) und einer darüber gesteigerten Kontraktionsfähigkeit charakterisiert (Hinz et al. 2001 a, Wang et al. 2006).

Interessanterweise findet *in vitro* die zelluläre Transdifferenzierung bereits in frühen Stadien der Kultivierung statt. Adulte und neonatale kardiale Fibroblasten gesunder Ratten exprimieren mit jeder neuen Passage (P) vermehrt Myofibroblasten-typische Markerproteine (s. o.). Verglichen mit Fibroblasten der Passage 0 wiesen P1-Zellen der adulten Ratte bereits Myofibroblasten-ähnliche Expressionsmuster auf, wobei dieser Prozess in neonatalen Tieren verzögert abzulaufen scheint (Baum und Duffy 2011, Santiago et al. 2010).

1.6 Kardiales *Remodeling*

Das kardiale *Remodeling* beschreibt die genetischen, molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen, die auf dem Boden einer Schädigung des Herzens entstehen und sich klinisch in Form von Änderung der Größe, der Form oder der Funktion des Herzens manifestieren (Cohn et al. 2000). Kardiales *Remodeling* stellt einen pathologischen Prozess dar, der als Folge von Myokardinfarkten, erhöhter Druckbelastung (z. B. arterielle Hypertonie, Aortenstenose), erhöhter Volumenbelastung (z. B. Herzklappeninsuffizienzen), entzündlicher Herzmuskel-erkrankung (z. B. Myokarditis) oder Kardiomyopathien entsteht. Gleichwohl kann sich dieser Prozess auch im gesunden Herzen als physiologische Anpassungsreaktion auf regelmäßigen Ausdauersport ereignen (Cohn et al. 2000), dieser Effekt wird als physiologisches *Remodeling* bezeichnet. Die komplexen, zellulären und molekularen Veränderungen im Prozess des *Remodelings* umfassen Hypertrophie der Kardiomyozyten, Nekrose (Tan et al. 1991), Apoptose (Olivetti et al. 1997,

Teiger et al. 1996), Fibroblastenproliferation (Villarreal et al. 1993), Steigerung der Sekretion von fibrillärem Kollagen (Weber et al. 1990) und Fibrose (Anderson et al. 1979, Cohn et al. 2000).

Kardiales *Remodeling* kann sich sowohl vorteilig als auch nachteilig auf die Herzfunktion auswirken. So kann Morphe und Funktion des Ventrikels dahingehend anpasst werden, dass der kardiale Auswurf trotz pathologisch erhöhter Volumenbelastungen, z. B. bei einer Mitralklappeninsuffizienz, aufrechterhalten wird (Cohn et al. 2000). Dauerhaft fortschreitendes *Remodeling* übt jedoch schädliche Einflüsse auf das Herz aus, geht mit einer schlechten Prognose einher und kann zur Entstehung bzw. zum Fortschreiten einer Herzinsuffizienz beitragen (Cohn et al. 2000, Gaudron et al. 1993, White et al. 1987).

1.6.1 Fibroblasten und Myofibroblasten im kardialen *Remodeling*

Kardiale Fibroblasten und Myofibroblasten spielen aufgrund ihrer EZM-regulierenden Funktion eine zentrale Rolle im kardialen *Remodeling* (Souders et al. 2009). Myokardiale Schädigung stimuliert Fibroblasten über mechanische und chemische Signalwege (siehe Kap. 1.5.2). Dieses führt zur Veränderung ihres Expressionsmusters, zur Differenzierung zu Myofibroblasten und zur Zellmigration in Richtung des verletzten Gewebes, wo sie Wundheilung und Narbenbildung fördern (Souders et al. 2009).

Als Reaktion auf Zytokine und Wachstumsfaktoren proliferieren Myofibroblasten und verändern die Struktur des Myokards (Brown et al. 2005, Lindsey et al. 2006, Raizman et al. 2007, Weber 2004). Sezerniertes IL-1 β , IL-6 und TNF- α induziert die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und initiieren darüber den massiven Abbau der EZM (Brown et al. 2005). Entzündungszellen migrieren in die strukturell aufgelockerte EZM und verstärken Migration, Proliferation und Differenzierung von kardialen Fibroblasten über die Freisetzung von Zytokinen (Camelliti et al. 2005). Die im geschädigten Myokard lokalisierten Myofibroblasten sezernieren Kollagen und üben mechanischen Zug auf die umgebende Matrix aus, worüber sie zum Wundverschluss und zur Narbenbildung beitragen (Gabbiani 2003, Sun und Weber 2000, Sun und Weber 2003). Während die EZM-Degradierung ein

Charakteristikum der Frühphase der Wundheilung darstellt, wird die Spätphase der Wundheilung und Narbenbildung durch vermehrte EZM-Sekretion (v.a. Kollagen) und Fibrose dominiert (Brown et al. 2005). Die Synthese und Sekretion von Kollagen wird durch die Einwirkung von AT II und Endothelin-1 gefördert (Sun und Weber 2000). Die Fibrosierung des Herzmuskels führt zur Neustrukturierung des Myokards, worüber die Herzfunktion und der kardiale Auswurf trotz initialer Schädigung erhalten werden kann (Cohn et al. 2000, Sabbah und Goldstein 1993). Während der Narbenreifung wird in vielen Zellen innerhalb der Narbe Apoptose induziert, sodass die reife Narbe hauptsächlich aus Kollagen und EZM-Proteinen besteht. Trotzdem persistieren weiterhin Myofibroblasten im Narbenareal, der genaue Grund hierfür ist unklar (Baum und Duffy 2011, Gurtner et al. 2008). Ihre Persistenz kann wiederum Ausgangspunkt einer kardialen Fibrose sein (siehe Kap. 1.7).

Während diese Prozesse zunächst vorteilhaft und notwendig für die Wundheilung und Aufrechterhaltung des kardialen Auswurfs sind, so kann ein Überschießen dieser Mechanismen die Herzfunktion letztlich auch nachhaltig verschlechtern. Beispielsweise kann die übermäßige Expression und Aktivierung von MMP über einen pathologisch gesteigerten EZM-Abbau zur Herzdilatation und zur systolischen Dysfunktion oder zu einer Reduktion der Ventrikeldicke mit möglicher Herzruptur als Folge führen (Brower und Janicki 2001, Hein et al. 2003, Kostin et al. 2000, Lopez et al. 2010, Sharov et al. 2005). Ein Überschießen der EZM-Sekretion hingegen kann in Herzfibrose (siehe Kap. 1.7), kardiale Dysfunktion und letztlich Herzinsuffizienz (Souders et al. 2009) münden.

1.7 Kardiale Fibrose

Kardiale Fibrose ist definiert als übermäßige und exzessive Akkumulation von fibrillärem Kollagen und EZM-Proteinen im myokardialen Gewebe und stellt ein häufiges histopathologisches Merkmal der Herzinsuffizienz dar (Manabe et al. 2002, Mewton et al. 2011, Schaper und Speiser 1992). Kardiale Fibrose ist Folge des kardialen *Remodelings* (Tamura et al. 2000) und kann daher auf dem Boden einer Vielzahl von Ursachen entstehen (siehe Kap. 1.6 und 1.6.1).

Abhängig von den zu Grunde liegenden Pathologien können drei Formen der Herzfibrose unterschieden werden: (i) reaktive interstitielle Fibrose, (ii) infiltrative interstitielle Fibrose und (iii) reparative Fibrose (Mewton et al. 2011). Reaktive interstitielle Fibrose ist gekennzeichnet durch die diffuse Akkumulation von Kollagen (v.a. Kollagen Typ I) innerhalb des Interstitiums und entsteht unabhängig von Myokardverlust. Verschiedene Stimuli können auslösend sein, wobei die Aktivierung des β -adrenergen Systems, die Aktivierung des RAAS und metabolische Störungen im Rahmen von arterieller Hypertonie und Diabetes Mellitus als Hauptursachen beschrieben sind (Boudina und Abel 2007, Factor et al. 1981, Tanaka et al. 1986, Weber und Brilla 1991). Die reparative Fibrose ist als Heilungsprozess von der reaktiven Fibrose abzugrenzen und entsteht als Folge von Myokardverlust. Sie beschreibt den Ersatz abgestorbener Kardiomyozyten (z. B. nach Zellschaden oder Nekrose) durch fibrilläres Kollagen, insbesondere durch Kollagen Typ I (Sutton und Sharpe 2000), welches die strukturelle Integrität des geschädigten Myokards gewährleistet, jedoch nicht die Funktion des untergegangenen Parenchyms ersetzt. Die infiltrative interstitielle Fibrose stellt eine Sonderform dar und wird durch die progressive Ablagerung unlöslicher, fibrillärer Proteine (z. B. Amyloide im Rahmen einer Amyloidose oder Glykosphingolipide bei *Morbus Fabry*) im Interstitium charakterisiert (Shah et al. 2006, Zarate und Hopkin 2008).

Die Aktivierung von profibrotischen Signalwegen basiert oft auf dem Untergang von Kardiomyozyten, wobei auch pathologische Druck- oder Volumenbelastung oder myokardiale Entzündung ohne initialen Zelltod eine Fibrose initiieren kann (Kong et al. 2014). Unterschiedliche Zelltypen spielen in der Ausbildung der Fibrose eine Rolle. So synthetisieren Fibroblasten und Myofibroblasten direkt Proteine der EZM, während Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Kardiomyozyten und Gefäßzellen profibrotische Botenstoffe sezernieren. Unabhängig der Ätiologie der Fibrose ist die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zentrales Element in der Ausbildung der Fibrose, da Myofibroblasten ursächlich für die übermäßige Produktion von EZM-Proteinen sind (Kong et al. 2014, Leask 2010).

Unterschiedliche Botenstoffe scheinen an der Ausbildung der kardialen Fibrose beteiligt zu sein. Nach Myokardschädigung lässt sich z. B. eine erhöhte Konzentration von TGF- β beobachten (Kane et al. 1991). TGF- β begünstigt die Hochregulation eines EZM-bildenden Genexpressionsmusters, während gleichzeitig die Expression von MMP herunterreguliert wird. Diese Konstellation begünstigt die Akkumulation von EZM-Proteinen (Leask 2008). AT II bewirkt nach Bindung an AT1-Rezeptoren (Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1) eine Steigerung der TGF- β -Expression in Kardiomyozyten oder Fibroblasten und unterstützt so die vermehrte Akkumulation von EZM-Proteinen (Campbell und Katwa 1997, Gao et al. 2009, Leask 2010, Yang et al. 2009). Auch Endothelin, ein vor allem von Endothelzellen, aber auch von anderen Zelltypen synthetisierter Mediator (Shi-Wen et al. 2006 a), kann die Myofibroblasten-Transdifferenzierung sowie die EZM-Synthese fördern (Leask 2008). CTGF, ein Angiogenese-assoziiertes Matrixprotein (Chien et al. 2011, Ponticos 2013), besitzt selbst nur schwache profibrotische Eigenschaften, ist als Kofaktor von TGF- β jedoch an der Fibroseinduktion beteiligt (Kennedy et al. 2007, Leask 2010, Mori et al. 1999, Shi-Wen et al. 2006 b). In unterschiedlichen, fibrotisch veränderten Geweben konnten hohe Konzentrationen an CTGF detektiert werden, daher kann CTGF als valider Marker für Fibroblasten- und Fibroseaktivität herangezogen werden (Daniels et al. 2009, Dziadzio et al. 2005). Daneben scheinen weitere Botenstoffe wie *platelet derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) oder der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF-1) einen Einfluss auf die Ausbildung einer kardialen Fibrose zu besitzen (Bishop und Lindahl 1999).

Zwei der zentralen Kompensationsmechanismen, die in der Herzinsuffizienz zunächst Pumpfunktion und Auswurfleistung aufrechterhalten, sind das RAAS und das sympathische Nervensystem. Chronische Aktivierung dieser Kompensationsmechanismen führt jedoch zu einer Verschlechterung der Herzfunktion (siehe Kap. 1.2 und Kap. 1.4.1). Fibroseinduktion stellt hierfür einen der Gründe dar. Neben dem profibrotischen Einfluss von AT II bewirken auch erhöhte Katecholaminspiegel mit der Zeit ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Kollagen Typ I und Typ III (Weber et al. 1993). Da fortschreitende Fibrose die verminderte Pumpfunktion des bereits insuffizienten Herzens weiter reduziert

und so einen Progress der Herzinsuffizienz bedingt, ist sie von großem Nachteil für den Krankheitsverlauf.

1.8 Antifibrotische Effekte von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP)

Der über Adenylylcyclasen generierte *second messenger* cAMP (siehe Kap. 1.4) stellt als Regulator der Fibroblastenaktivität ein besonders interessantes Molekül im Kontext der Fibrose dar. Das antifibrotische Potential von cAMP konnte in vielen Forschungsarbeiten gezeigt werden, so wirken erhöhte cAMP-Spiegel inhibitorisch auf die Synthese und Funktion profibrotischer Botenstoffe (Insel et al. 2012 b, Liu et al. 2006, Swaney et al. 2005), hemmen die Fibroblastenproliferation und die Myofibroblasten-Transdifferenzierung (Huang et al. 2008, Liu et al. 2004, Selige et al. 2010). Zudem wurde eine cAMP-vermittelte Apoptoseinduktion (Insel et al. 2012 a, Zhang et al. 2011), Reduktion der Motilität (Togo et al. 2009, Yokoyama et al. 2008) und Abnahme der Synthese/Freisetzung von ECM-Komponenten in Fibroblasten beschrieben (Chan et al. 2010, Insel et al. 2012 b, Liu et al. 2008, Miller et al. 2011). Die antifibrotischen Effekte von cAMP werden neben der lange Zeit als exklusiv angenommenen PKA-Aktivierung (Cohen 2002, Zambon et al. 2005) auch PKA-unabhängig über die Aktivierung von Epac (*exchange protein activated by cAMP*) und über Inhibition von intrazellulären SMAD-Proteinen vermittelt (Bos 2003, Breckler et al. 2011, de Rooij et al. 1998, Gloerich und Bos 2010, Grandoch et al. 2010, Insel et al. 2012 b, Kawasaki et al. 1998, Roscioni et al. 2008, Schinner et al. 2015, Yokoyama et al. 2008). Als Guanin-Nukleotid-Austauschprotein und damit Aktivator der GTPase Rap1 reguliert Epac unterschiedliche Zellfunktionen wie Migration oder Proliferation und wirkt antifibrotisch, z. B. durch Inhibition der Kollagen-Expression (Okumura et al. 2014, Schinner et al. 2015, Yokoyama et al. 2008).

Ebenso ist das antifibrotische Potential von cGMP-regulierten Signalwegen aus der Literatur bekannt (Beyer et al. 2015, Miller et al. 2011, Schinner et al. 2015, Vettel et al. 2014). Die Generierung von cGMP verläuft über zwei unterschiedliche Mechanismen. So kann von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) freigesetztes NO die lösliche Guanylylcyclase aktivieren, welche die Synthese von cGMP aus GTP

katalysiert. Ebenso wird cGMP von membranständigen Guanylylcyclasen nach Aktivierung durch natriuretische Peptide (ANP, BNP) gebildet. Sein Abbau erfolgt wie bei cAMP über Hydrolyse durch Phosphodiesterasen (PDE) (Schinner et al. 2015). Die antifibrotischen Effekte von cGMP werden vornehmlich über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) vermittelt, welche selbst inhibitorisch auf das stark profibrotische Zytokin TGF β und dessen Signalwege wirkt (Beyer et al. 2015, Schinner et al. 2015). So konnte z. B. gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung von löslichen Guanylylcyclasen über BAY 41-2272 die TGF β -gesteuerte Stimulation der Kollagenfreisetzung inhibiert und die Myofibroblasten-Transdifferenzierung zum Teil sogar umkehren kann (Beyer et al. 2015). Auch die Inhibition der in Myofibroblasten vermehrt exprimierten PDE1 kann über erhöhte cGMP-Spiegel und eine gesteigerte Aktivierung der PKG die TGF β -induzierte Myofibroblasten-Aktivierung im Herzen, die Synthese von EZM-Komponenten und die Expression von profibrotischen Genen reduzieren (Miller et al. 2011, Schinner et al. 2015).

Darüber hinaus konnte eine Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe via PDE2-Überexpression in Fibroblasten die antifibrotischen Effekte von cAMP und cGMP aufzeigen (Vettel und Lämmle et al. 2014). Hierbei reduzierte die Überexpression der PDE2 deutlich basale und auch Isoprenalin-induzierte cAMP-Spiegel, welches die Myofibroblasten-Transdifferenzierung begünstigte und zu einer erhöhten Steifigkeit von (aus kardialen Fibroblasten generiertem) *engineered connective tissue* (ECT) führte. Interessanterweise konnte die PDE2-vermittelte Myofibroblasten-Transdifferenzierung über Steigerung der cGMP-Synthese durch ANP und Nitroprussid-Natrium antagonisiert werden. Im Kontext der Herzinsuffizienz scheinen cAMP und cGMP als antifibrotische Mediatoren eine protektive Rolle zu spielen.

1.9 Zielsetzung

Kardiale Fibroblasten bilden den zellulären Hauptbestandteil des Herzens und stellen einen bedeutenden Regulator der Herzfunktion im gesunden und im erkrankten Herzen dar. Im Kontext des kardialen *Remodelings* in der Herzinsuffizienz nehmen Fibroblasten eine Schlüsselrolle ein, da sie aufgrund ihrer EZM-regulierenden Funktion Ausgangspunkt für die Entwicklung einer kardialen Fibrose sind. Zunehmende Fibrosierung des bereits geschädigten Myokards führt zu einer Verminderung der Pumpfunktion und mündet somit in einen Progress der Herzinsuffizienz. Die zunächst kompensatorische Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der Herzinsuffizienz kann chronisch im Verlauf Herzfibrose induzieren. Vor diesem Hintergrund sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich eine Beeinflussung Fibrose-assoziiierter Proteine durch extrazelluläre Stimulation der β -adrenergen Signalkaskade mittels Isoprenalin oder durch intrazelluläre Verstärkung des β -adrenergen Signalweges via Überexpression des Phosphatase-Inhibitors-1 (I-1), eines distal von cAMP lokalisierten, β -adrenerge Signaltransduktion verstärkenden Elements innerhalb der Signalkaskade, beobachten lässt. Darüber hinaus sollte die endogene I-1-Expression in kardialen Fibroblasten der Maus, der Ratte und des Menschen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellpräparation neonataler Rattenfibroblasten und -kardiomyozyten

Für die Zellisolierung neonataler Rattenfibroblasten (nRFB) und neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM) wurden ca. 70 – 90 männliche und weibliche neugeborene (1 – 3 Tage postnatal) Wistar-Kyoto-Ratten (Herkunft: Charley River, Sulzfeld) pro Präparation verwendet. Die Zucht erfolgte in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gemäß den Tierschutzbestimmungen des Landes Niedersachsen, der NIH-Richtlinien (National Institutes of Health, Bethesda, USA) und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzrechtes. Aktenzeichen: „G 12/950: I-1 als therapeutisches Target in der Experimentellen Herzinsuffizienz“.

2.1.1.1 Organentnahme und Ventrikelseparation

Die neonatalen Tiere wurden dekapitiert und der Thorax durch Sternotomie geöffnet. Die Herzen wurden komplett entnommen und in eine Zellkulturschale (15 cm, Sarstedt) mit eisgekühltem Calcium- und Bicarbonat-freiem Hanks-Puffer mit HEPES (CBFHH, siehe Kap. 2.7.1) überführt. Behutsam wurden die Vorhöfe und Gefäßbänder von den Ventrikeln getrennt, sodass die präparierten Ventrikel in sterilfiltriertes und eisgekühltes CBFHH transferiert werden konnten. Blutreste wurden entfernt, indem die Ventrikel 4x mit 10 ml eisgekühltem CBFHH gewaschen worden waren. Nach Absaugen des CBFHH wurden die Ventrikel mit einer Präparationsschere bis auf eine Größe von unter 1 mm³ zerkleinert. Die Gewebstücke wurden in 2 ml CBFHH aufgenommen und in ein steriles 50-ml-Sammelgefäß (Sammelgefäß 0, Eppendorf) überführt. Zur Entfernung weiterer Blutreste wurden die Gewebstücke erneut 4x in eisgekühltem CBFHH gewaschen.

2.1.1.2 Enzymatischer Gewebeverdau

Die enzymatische Gewebeaufbereitung mittels Trypsin und DNase erfolgte nach einer modifizierten Methode von Webster *et al.* (Webster *et al.* 1993). Trypsin ist eine Peptidase und spaltet Peptidbindungen via Hydrolyse (Whitcomb und Lowe

2007). Als Peptidase kann Trypsin Zell-Zellverbindungen trennen, wodurch sich Gewebestücke auflösen und in Einzelzellen separieren lassen. Im Rahmen des Verdauprozesses kommt es aber auch zu Nekrose- und Apoptosereaktionen. Die abgestorbenen Zellen setzen DNA frei, die wiederum die unspezifische Aggregation zwischen bereits gelösten Zellen und Gewebestücken vermittelt. Diese Gewebeverklumpungen lassen sich durch den Einsatz von DNasen lösen.

Für den Vorverdau wurden die Gewebestücke in 9 ml der Trypsin-Arbeitslösung (siehe Kap. 2.7.1) auf einer dauerhaft schwenkenden Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min, Biometra) bei Raumtemperatur (RT) für 10 min inkubiert. Nach Sedimentation der Gewebestücke wurde der trübe Überstand vorsichtig entfernt und verworfen. Es folgte der eigentliche Verdau (siehe Tab. 1). Die Gewebestücke wurden in 9 ml der Trypsin-Arbeitslösung aufgenommen, auf der Kippwippe bei RT für 4 min inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Überstand wurde mit einer weitlumigen 10-ml-Pipette (Eppendorf) in ein steriles mit 5 ml fötalem Kälberserum (FCS, Trypsin-inaktivierend) gefülltes 50-ml-Sammelgefäß (Sammelgefäß 1, Eppendorf) überführt. Im nächsten Schritt wurden die Gewebestücke mit 8 ml DNase-Arbeitslösung (siehe Kap. 2.7.1) versetzt und etwa 20 – 25 mal resuspendiert. Der nach erneuter Sedimentation entstandene Überstand wurde ebenfalls in das Sammelgefäß 1 gegeben. Die alternierende Gewebeinkubation in der Trypsin- bzw. DNase-Arbeitslösung mit Überführung des Überstandes in das Sammelgefäß 1 wurde solange fortgeführt, bis das Sammelgefäß gefüllt war. Die Volumina der Arbeitslösungen wurden jeweils um 0,5 ml nach jedem Wechsel auf ein neues Sammelgefäß reduziert. Der Verdau wurde sodann, wie oben beschrieben, fortgeführt. Ein Endvolumen von 6 ml Trypsin-Arbeitslösung respektive 5 ml DNase-Arbeitslösung wurden nicht unterschritten.

Nach dem Gewebeverdau wurden die Sammelgefäße 1 – 8 bei 4 °C und 60 g für 15 min zentrifugiert (*Centrifuge 5804 R*, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden jeweils in 2 ml eisgekühltes NKM-Medium (Nicht-Kardiomyozyten-Medium, siehe Kap. 2.7.1) resuspendiert und in einem sterilen 50-ml-Sammelgefäß zusammengeführt. Zur Vermeidung von Zellaggregationen wurden die Pellets mit 250 µl der DNase1-Stammlösung (siehe Kap. 2.7.1) pro 30

ml Zellsuspension versetzt und vorsichtig resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 40 °C und 60 g für 15 min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml NKM-Medium aufgenommen und erneut behutsam resuspendiert. Im Anschluss wurden die vereinzelteten Zellen durch ein vorher mit NKM-Medium befeuchtetes Zellsieb (Maschengröße 250 µm) filtriert und das Zellfiltrat in einer sterilen Zellkulturschale (15 cm, Sarstedt) aufgefangen. Die filtrierte Zellsuspension wurde sodann in ein steriles, auf Eis gekühltes 50-ml-Sammelgefäß transferiert.

Zur Bestimmung der ungefähren Zellzahl wurden die Zellen mit Trypan-Blau (AppliChem) gefärbt. Dieser Farbstoff reichert sich in abgestorbenen Zellen an, vitale Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht gefärbt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer (*Neubauer-improved*, Laboroptik) gegeben. Nach Zellzählung erfolgte die Hochrechnung der Gesamtzellzahl.

Sammelgefäß	Trypsin- Arbeitslösung (ml)	Inkubationszeit der Trypsin- Arbeitslösung (min)	DNase- Arbeitslösung (ml)
1	9,0	4	8,0
2	8,5	4	7,5
3	8,0	4	7,0
4	7,5	3	6,5
5	7,0	2	6,0
6	6,5	1	5,5
7	6,0	1	5,0
8	6,0	1	5,0

Tab. 1: Zellpräparation neonataler Rattenfibroblasten und -kardiomyozyten. Ablauf des enzymatischen Gewebeverdaus neonataler Rattenherzen.

2.1.2 Zellpräparation neonataler Mausfibroblasten und -kardiomyozyten

Für die Zellpräparation neonataler Mausfibroblasten (nMFB) und neonataler Mausekardiomyozyten (nMKM) wurden die Herzen von 60-70 männlichen und weiblichen neonatalen Mäusen verwendet. Die Zucht erfolgte in der Zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gemäß den Tierschutzbestimmungen des Landes Niedersachsen, den NIH-Richtlinien (National Institutes of Health, Bethesda, USA) und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzrechtes. Aktenzeichen: „G 12/950: I-1 als therapeutisches Target in der Experimentellen Herzinsuffizienz“. Die Organentnahme wurde, wie in Kap. 2.1.1.1 beschrieben, durchgeführt. Aufgrund der geringen Herzgröße konnten Vorhöfe und Gefäßstiele nicht sicher von den Ventrikeln getrennt werden. Der enzymatische Gewebeverdaulichkeit erfolgte weitestgehend analog zum Protokoll der Rattenzellpräparation. Es wurden lediglich geringere Volumina an Trypsin- und DNase-Arbeitslösungen im Vorverdaulichkeit (8 ml Trypsin) und während der folgenden Digestionsschritte verwendet (siehe Tab. 2).

Sammelgefäß	Trypsin-Arbeitslösung (ml)	Inkubationszeit der Trypsin-Arbeitslösung (min)	DNase-Arbeitslösung (ml)
1	8,0	4	7,0
2	7,5	4	6,5
3	7,0	4	6,0
4	6,5	3	5,5
5	6,0	2	5,0
6	6,0	1	5,0
7	6,0	1	5,0
8	6,0	1	5,0

Tab. 2: Zellpräparation neonataler Mausfibroblasten und -kardiomyozyten. Ablauf des enzymatischen Gewebeverdaulichkeit neonataler Mausherzen.

2.1.3 Separation von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten aus neonatalen Mäusen und Ratten via *Pre-Plating*

Die im Rahmen der Zellpräparation gewonnene Zellsuspension enthielt sowohl kardiale Fibroblasten als auch Kardiomyozyten (nRFB/nRKM und nMFB/nMKM). Zur Trennung dieser beiden Zellpopulationen wurden ihre unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften genutzt. Während kardiale Fibroblasten schneller an der unbehandelten Oberfläche von Zellkulturschalen adhären, setzen sich Kardiomyozyten erst später ab und verbleiben dadurch länger im Kulturüberstand (Bouzeghrane und Thibault 2002, Villarreal et al. 1993). Zur Zellseparation wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf Zellkulturschalen (15 cm, Sarstedt) verteilt und mit 15 ml NKM-Medium versetzt. Die ausgesäten Zellen wurden in einem Inkubator (*Steri-Cult 200 Incubator*, Forma Scientific) bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 1 h inkubiert. Danach wurde das überwiegend nRKM bzw. nMKM enthaltende Medium mit einer weitlumigen 10-ml-Pipette (Falcon) vorsichtig abgenommen, in ein steriles 50-ml-Sammelgefäß (Eppendorf) überführt und bei 4 °C und 60 g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5-Brom-2'-deoxyuridin-haltigem (BrdU, AppliChem) KM-Medium (Kardiomyozyten-Medium, siehe Kap. 2.7.1) resuspendiert, um eine Überwachsung durch proliferierende Zellen zu verhindern. Für Folgeversuche wurden die KM auf kollagenbeschichteten Zellkulturschalen verteilt. Die an der Oberfläche der Zellkulturschale adhärenen nRFB bzw. nMFB wurden behutsam zweimalig mit Fibroblasten-Medium (siehe Kap. 2.7.1) gespült und anschließend in 15 ml Fibroblasten-Medium im Inkubator kultiviert.

2.1.4 Zellpassagierung neonataler Maus- und Rattenfibroblasten

Die nRFB/nMFB wurden in dem Fibroblasten-Medium im Inkubator (*Steri-Cult 200 Incubator*, Forma Scientific) bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit bis zu einer Konfluenz von ca. 70 - 90% kultiviert und anschließend passagiert. Dafür wurden die Zellen zweimalig mit 15 ml Mg²⁺- und Ca²⁺-freiem PBS (Gibco) gespült. Zur Ablösung der adhärenen Zellen wurden diese mit 8 ml Trypsin-EDTA (0,05%, Gibco) im Inkubator für 5 min inkubiert. Um den Verdau zu stoppen, wurden 16 ml FCS-haltiges Fibroblasten-Medium hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in ein steriles 50-ml-Sammelgefäß überführt und bei 4 °C und 1.500 rpm für 3 min

zentrifugiert (*Centrifuge 5804 R*, Eppendorf). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in frischem Fibroblasten-Medium sorgfältig resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellen auf Zellkulturplatten oder Zellkulturschalen ausgesät. Für die jeweiligen Versuche wurden nRFB/nMFB der 1. Passage verwendet. Die für die Zellpassage verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.1.5 Aktivierung cGMP-abhängiger Signalkaskaden mittels atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und Nitroprussid-Natrium (SNP)

Auf 6-Well-Platten ausgesäte nRFB der ersten Passagen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90% im Fibroblasten-Medium kultiviert. 3 h vor Zellstimulation wurden die Zellen vom Medium befreit, mit erwärmtem PBS gespült und mit 3 ml serumfreiem Interventionsmedium pro Well überschichtet. Anschließend erfolgte die Zellstimulation mit 1 µM ANP (Bachem), einem Aktivator der membranständigen Guanylylcyclase-A (GC-A), oder 40 µM SNP (Roth), einem Stickstoffmonoxid-Donor (NO-Donor), welcher über die Freisetzung von NO die intrazelluläre Guanylylcyclase aktiviert, über einen Zeitraum von 24 h.

2.1.6 Aktivierung cAMP-abhängiger Signalkaskaden mittels Isoprenalin

Zur β-adrenergen Zellstimulation wurde Isoprenalin (Isoprenalin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich), ein unselektives β-Sympathomimetikum, verwendet. Hierfür wurde zunächst eine 100 mM Isoprenalin-Stocklösung angesetzt. Zur Herstellung verschieden konzentrierter Isoprenalin-Arbeitslösungen (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) wurde die Isoprenalin-Stocklösung entsprechend mit *aqua ad iniectabilia* verdünnt. Die zu stimulierenden nRFB der ersten Passage wurden auf 6-Well-Platten (Nunc) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-90% im Fibroblasten-Medium kultiviert. 3 h vor der Isoprenalin-Stimulation wurden die Zellen behutsam mit erwärmtem PBS gespült und mit 3 ml serumfreiem Interventionsmedium (siehe Kap. 2.7.1) pro Well überschichtet. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit den unterschiedlich konzentrierten Isoprenalin-Arbeitslösungen versetzt und für 24 h in einem Inkubator inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit (12 h) wurde erneut die entsprechend konzentrierte Isoprenalin-Arbeitslösung auf die Zellen gegeben.

2.1.7 Selektive Blockade der β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Subtypen

Die subtypspezifische Blockade der β -AR erfolgte über die Behandlung der jeweiligen Zellen mit dem selektiven β_1 -Antagonisten CGP 20712 Dihydrochlorid (CGP, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM) und/oder dem selektivem β_2 -Antagonisten ICI 118,551 Hydrochlorid (ICI, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM) in den angegebenen Konzentrationen. Hierfür wurden zunächst Stock-Lösungen (jeweils 1 μ M) erstellt und mit *aqua ad iniectabilia* verdünnt. Die auf 6-Well-Platten (Nunc) adhärenen nRFB der Passage 1 (Konfluenz von ca. 70–90%) wurden 3 h vor Hinzugabe von CGP oder ICI vom Fibroblasten-Medium befreit, behutsam in PBS gespült, über Nacht in serumfreiem Interventionsmedium kultiviert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen (s. o.) an β -AR-Antagonisten für 10 min behandelt. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit 100 nM Isoprenalin für 10 min.

2.1.8 Adenovirale Transduktion

Für die adenoviral vermittelte Transduktion wurden auf 6-Well-Platten (Nunc) kultivierte nRFB (P1) verwendet. Die Zellen wurden zunächst zweimal in PBS gewaschen und mit 2 ml serumfreiem Transduktionsmedium (siehe Kap. 2.7.1) pro Well versetzt. Danach wurden die jeweiligen Adenoviren (Ad-I-1, Ad-I-1c, Ad-eGFP, siehe Tab. 3) in das Medium pipettiert, wobei in einem Vorversuch die jeweils optimale MOI (*multiplicity of infection*) identifiziert wurde. Die Viren wurden in einer MOI von 100-300 verwendet. Nach Überführung in den Inkubator (*Steri-Cult 200 Incubator*, Forma Scientific) erfolgte eine dreistündige Inkubationsphase. Im Anschluss wurde das virushaltige Medium abgesaugt, autoklaviert und verworfen. Die transduzierten Zellen wurden in 3 ml Fibroblasten-Medium pro Well für 24 h bis zur weiteren Verwendung kultiviert. Die adenoviralen Konstrukte (Ad-I-1, Ad-I-1c, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. rer. nat. Katrin Wittköpper aus unserer Arbeitsgruppe), kodieren neben dem I-1-Konstrukt auch für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), wobei die Regulation über einen separaten Promotor (Cytomegalievirus-Promotor, CMV-Promotor) verläuft (Anderson et al. 1979, El-Armouche et al. 2003 a, He et al. 1998). Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein ausschließlich eGFP-kodierendes Virus (Ad-eGFP) verwendet. Die Transduktionsseffizienz wurde vor jeder weiteren Verwendung der transduzierten

Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (*Axiocvert 200*, Zeiss) kontrolliert, indem die Relation zwischen grün-fluoreszierenden (transduzierten) und nicht-fluoreszierenden (nicht-transduzierten) Zellen analysiert wurde.

Virus	Konzentration baV (biologisch aktive Viruspartikel)/ μ l
Ad-I-1c	2,2 x 10 ⁸
Ad-I-1	4,3 x 10 ⁸
Ad-eGFP	1,5 x 10 ⁷

Tab. 3: Adenovirale Transduktion. Verwendete Adenoviren und ihre entsprechenden Konzentrationen.

2.2 RNA-Analytik

2.2.1 Isolation von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte aus adhärennten Zellen, die bis zu einer Konfluenz von ca. 70-90% auf 6-Well-Zellkulturplatten (Nunc) kultiviert wurden. Hierfür wurde das *SV Total RNA Isolation System Kit* (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS (Gibco) gespült. Danach wurden die Zellen mit 175 μ l RNA-Lyse-Puffer (Promega, siehe Kap. 2.7.2) pro Well auf Eis inkubiert und im Anschluss mit einem Zellschaber gelöst, um sie in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführen zu können. Das im RNA-Lyse-Puffer enthaltene Guanidiniumthiocyanat (GTC) sowie β -Mercaptoethanol inaktiviert die im Lysat vorhandenen Ribonukleasen, um die hydrolytische Spaltung der zu isolierenden RNA zu verhindern (Chirgwin et al. 1979). Als Nächstes wurde jedes Reaktionsgefäß mit 350 μ l des RNA-Dilutionspuffers (Promega) versetzt, behutsam invertiert und in einem Wärmeschüttler (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 70 °C für 3 min inkubiert. Die folgende Zentrifugation (*Centrifuge 5417 R*, Eppendorf) des Gemisches erfolgte bei 13.000 rcf und 4 °C für 10 min. Die hohe Konzentration an GTC im RNA-Lyse-Puffer bewirkte eine Präzipitation der im Reaktionsansatz vorhandenen zellulären Proteine, die durch Zentrifugation von der noch gelösten RNA getrennt wurden. Der Überstand wurde sodann in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 μ l

95% Ethanol zur Fällung der RNA versetzt und behutsam invertiert. Zur Bindung der gefällten RNA wurde eine Silica-Membran (eingefasst in Zentrifugationssäulen, Promega) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde in die Zentrifugationssäulen gegeben und über Kollektoren bei 13.000 rcf und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Hierdurch lagert sich RNA an der Silica-Membran ab. Zur Entfernung von Zell- oder Proteinresten wurde auf jede Säule 600 µl RNA-Waschlösung (Promega, siehe Kap. 2.7.2) gegeben und erneut bei 13.000 rcf und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Hiernach wurde der DNase-Inkubationspuffer (siehe Kap. 2.7.2) direkt auf die Membran gegeben und bei RT für 15 min inkubiert, um die RNA von residueller DNA zu befreien. Durch Hinzufügen von 200 µl der DNase-Stop-Lösung (Promega, siehe Kap. 2.7.2) und Zentrifugation bei 13.000 rcf und 4 °C für 1 min wurde der Verdau der DNA gestoppt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit RNA-Waschlösung und Zentrifugation von restlichen Verunreinigungen befreit (600 µl RNA-Waschlösung und Zentrifugation bei 13.000 rcf und 4 °C für 1 min, anschließend 250 µl RNA-Waschlösung und Zentrifugation bei 14.500 rcf und 4 °C für 2 min). Die Säulen mit der aufgereinigten RNA wurden in sterile Reaktionsgefäße gestellt. Zur Elution der RNA wurden 15 µl nukleasefreies Wasser zentral auf die Membran gegeben und die Säulen letztmalig bei 12.000 rcf und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Direkt anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung (Spectrophotometer *NanoDrop 1000*, Thermo Scientific) der RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml entsprach einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die eluierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist eine molekularbiologische Methode, welche das Umschreiben von mRNA unter Einsatz einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einzelsträngige cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) ermöglicht (Baltimore 1970, Bustin 2000, Temin und Mizutani 1970). Zum Umschreiben der isolierten RNA-Proben (siehe Kap. 2.2.1) wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zunächst erfolgte die Herstellung des Mastermixes (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 8) mit und ohne (Negativkontrolle, siehe Kap.

2.8.2, Tab. 9) katalysierende reverse Transkriptase (*MultiScribeTM Reverse Transcriptase*, Applied Biosystems) auf Eis. 1000 ng isolierte RNA wurden mit nukleasefreiem Wasser (Promega) auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und zusammen mit 10 µl des jeweiligen Mastermix in einem PCR-Gefäß (Eppendorf) vermischt. Anschließend wurde ein vorgeheizter PCR-Thermozykler (*Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler*, Eppendorf) mit den Reaktionsgefäßen beladen, entsprechend programmiert (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 10) und gestartet. Die als Reaktionsprodukt entstandene cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Alle Proben einer Versuchsreihe wurden im gleichen Ansatz bearbeitet.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al. 1986, Mullis 1990). In Abhängigkeit von der DNA-Vorlage (*template* DNA) und Primern, kurzen DNA-Fragmenten mit definierten und zur Ziel-DNA komplementären Sequenzen, verbindet die DNA-Polymerase pro Zyklus Nukleotide zu einem PCR-Produkt. Dabei ist die Reaktion temperaturabhängig. Zunächst wird die doppelsträngige DNA zur Trennung der DNA-Stränge erhitzt (Denaturierung). Danach wird die Temperatur abhängig von den verwendeten Primern gesenkt, um die Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge (Bindung an das jeweilige 3'-Ende) zu ermöglichen (Primerhybridisierung). Nach anschließender Erhöhung der Temperatur synthetisiert die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung einen komplementären DNA-Strang (Elongation). Pro Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt.

Im Folgenden wurde die zuvor aus muriner RNA (isoliert aus adulten Kardiomyozyten und Fibroblasten der Maus, bereitgestellt von Frau M.Sc. Simin Chen, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie im Herzzentrum Göttingen) umgeschriebene cDNA (siehe Kap. 2.2.2) unter Verwendung Maus-spezifischer I-1 Primer (m_I-1-for, m_I-1-rev, siehe Kap. 2.8.2, Tab. 7) amplifiziert. Hierfür wurde cDNA (umgeschrieben aus 1000 ng mRNA) in ein PCR-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit den Primern, nukleasefreiem Wasser (Promega) und 12,5 µl des *GoTaq[®] Green Master Mix* (Taq-Polymerase, Promega) vermischt (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 2.13). Anschließend wurde ein vorgeheizter PCR-Thermozykler

(Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler, Eppendorf) mit den Reaktionsansätzen (Gesamtvolumen 25 µl) beladen, entsprechend programmiert (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 14) und gestartet. Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Separation im Agarosegel.

2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Es wurde das *7900HT Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zur Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit wurde der interkalierende, an doppelsträngige DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I (Thermo Scientific) eingesetzt. Nach Bildung eines DNA-Fluoreszenzfarbstoffkomplexes kann dieser durch Licht der Wellenlänge 494 nm (Absorptionsmaximum) zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm (Emissionsmaximum) angeregt werden. Das emittierte Fluoreszenzsignal steigt proportional zur zunehmenden DNA-Konzentration an. Durch Echtzeitmessungen des Fluoreszenzsignals während eines jeden PCR-Zyklus kann die Menge der amplifizierten DNA ermittelt werden.

Für jeden Ansatz wurden je 50 ng als cDNA umgeschriebene mRNA mit dem SYBR[®] Green/ROX qPCR Master Mix sowie mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern und nukleasefreiem H₂O vermengt. Zur späteren Normalisierung der Proben wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) analysiert. Die jeweiligen Reaktionsansätze, die Primersequenzen und das verwendete PCR-Zyklerprogramm sind im Materialteil (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 11 und Tab. 12) aufgeführt. Zur Bestimmung der relativen Transkription wurden die jeweiligen berechneten Zyklenzahlen bis zur halbmaximalen Amplifikation (*cycle threshold*, CT) unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel verglichen. Dabei spiegelt der CT-Wert die Anzahl der PCR-Zyklen wider, welche notwendig ist, um eine definierte Fluoreszenzintensität innerhalb der Proben zu erreichen. Zur Normalisierung wurde zunächst der CT-Wert eines Kontrollgens (GAPDH) vom CT-Wert des analysierten Gens (z. B. I-1) subtrahiert ($\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Kontrollgen}$). Anschließend wurde vom ΔCT -Wert der zu analysierenden bzw. behandelten Probe

(z. B. neonatale, kardiale Mausfibroblasten) der ΔCT -Wert der Kontrollprobe (z. B. neonatale Mauskardiomyozyten) subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}$ -Wert behandelte Probe - ΔCT -Wert Kontrolle). Die Ratio $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ gibt den relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und Kontrolle an (Livak und Schmittgen 2001).

2.2.5 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente (siehe Kap. 2.2.3) wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde Agarose in TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer, 1x konzentriert, siehe Kap. 2.7.2) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde der Gelmasse 0,5 µl/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Anschließend wurde das noch flüssige Gel in die Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad) gegossen und mit einem Kamm (Bio-Rad), zur Herstellung von Ladekammern versehen. Nach der Aushärtung wurde die Laufkammer mit TAE-Puffer (1x konzentriert) gefüllt und das vollständig mit Puffer bedeckte Gel nach Entfernung der Käme mit den jeweiligen Proben beladen. Als Positivkontrolle diente rekombinantes I-1 in pcDNA. Zur Größenbestimmung wurde ein Größenmarker (*DNA-Ladder-Mix*, Thermo Scientific) mitgeführt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 120 V. Im Anschluss wurden die separierten DNA-Fragmente im *Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR Imaging System* (Bio-Rad) unter UV-Licht (320 nm) detektiert.

2.3 Proteinanalytik

2.3.1 Proteinisolation aus adhärennten Zellen

Die auf 6-Well-Platten adhärennten Zellen wurden zunächst zweimal mit 3 ml PBS (37 °C) gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*, siehe Kap. 2.7.3) Lysepuffer (120 µl pro Well) für 20 min auf Eis. Die lysierten Zellen wurden nun mit einem Zellschaber (Sarstedt) gelöst und das Homogenat in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Es folgte die Zentrifugation (*Centrifuge 5417R*, Eppendorf) bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min. Der Überstand des Zentrifugats wurde aliquotiert und für die Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kap. 2.3.2) genutzt. Die in SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat)-Auftragspuffer denaturierten Aliquote wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration in den Lysten wurde nach einer Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einem Farbumschlag des Coomassie Brilliant Blau-haltigen Bradford-Reagenz (Roti[®]-Nanoquant, 5x konzentriert, Roth). Die protonierte Form des Bradford-Reagenz (bräunlich-rot) wird über Proteinbindung in ihre anionische Form (blau) überführt. Das initiale Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) verschiebt sich dabei auf 595 nm (blau). Die Konzentration der an Farbstoff gebundenen Proteine kann somit photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt werden (Compton und Jones 1985). Die Berechnung der unbekanntenen Konzentrationen erfolgte anhand einer zuvor bestimmten Standardreihe, welche unter Verwendung von Rinder-Immunglobulin G (0,34 mg/ml, Sigma-Aldrich) und folgendem Schema (siehe Tab. 4) erstellt wurde:

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Bovines IgG-Standard (0,34 mg/ml) (μl)	NaOH (0,1 M) (μl)	Bradford-Reagenz (μl)
0	0	800	200
85	5	795	200
170	10	790	200
340	20	780	200
510	30	770	200
680	40	760	200
850	50	750	200
1020	60	740	200

Tab. 4: Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford. Pipettierschema zur Erstellung einer Standardreihe mit Immunglobulin G (IgG).

Die Proben wurden gut vermischt und bei RT für 10 min inkubiert. Dann wurden die Proteinkonzentrationen der Standardreihe photometrisch (BioPhotometer 6131, Eppendorf) bei 595 nm ermittelt. Im Anschluss wurden 5 μl des zu bestimmenden Proteinisolates mit 795 μl 0,1 M NaOH verdünnt, mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt und vermengt. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Bestimmung (595 nm) der Proteinkonzentrationen. Sowohl die Messungen der Standardreihe als auch die Messungen der zu analysierenden Proben erfolgten als Doppelbestimmung, um Messungenauigkeiten zu minimieren.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfat*-, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse (Laemmli 1970, Shapiro et al. 1967, Weber und Osborn 1969). Dazu werden Proteinlysate in 6x konzentriertem Puffer nach Laemmli (Laemmli 1970) (siehe Kap.2.7.3) im Verhältnis 5:1 bei 95 °C für 5 min

gekocht. Dieser Prozess führt zur Denaturierung der Proteine. Das im Puffer enthaltene anionische Detergenz SDS umschließt die Proteine und führt zusammen mit der Denaturierung zum einen zur Linearisierung, und zum anderen überdeckt es deren Eigenladung, sodass eine konstant negative Ladung überwiegt. In einem Spannungsfeld migrieren die negativ geladenen, zuvor auf eine spezielle Gelkombination (Sammelgel: pH 6,8; Trenngel: pH 8,8) aufgetragenen Proteine in Richtung der Anode. Hierfür wird ein Puffer mit einer hohen Konzentration an Glycin eingesetzt. Während im Sammelgel negativ geladene Chloridionen vor und Glycin hinter den Proteinen „wandern“, migrieren im relativ basischen Trenngel Chloridionen und Glycin vor den Proteinen, da Glycin im basischen Milieu vorwiegend in anionischer Form vorliegt und seine positive Ladung verliert. Durch den pH-Gradienten zwischen Trenn- und Sammelgel „überholt“ Glycin im Übergang von Sammel- zu Trenngel die Proteine und bedingt so einen Konzentrierungseffekt. Die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE ist dabei u.a. abhängig vom Reibungskoeffizienten (% Acrylamid), von der Ladung des SDS-Proteinkomplexes und der angelegten elektrischen Feldstärke (V/m). Proteine niedriger Masse bewegen sich schneller anodenwärts, während größere Proteine in derselben Zeit eine kürzere Wegstrecke zurücklegen (Mahmood und Yang 2012). Die Mobilität der SDS-Proteinkomplexe ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.

Nach Herstellung und Aushärtung von Trenn- und Sammelgel (siehe Kap. 2.7.3) erfolgte die Beladung des Sammelgels mit den denaturierten Proteinisolaten. Zur Kontrolle der Proteinauftrennung sowie zur ungefähren Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsmarker (*Precision Plus Protein StandardsTM*, *All Blue*, Bio-Rad) mitgeführt. Die beladenen Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (*Mini Protean[®] electrophoresis cell*, Bio-Rad) überführt, welche zuvor mit Laufpuffer (siehe Kap. 2.7.3) befüllt wurde. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Feldstärke von 80 V für 15-20 min innerhalb des Sammelgels und bei 120 V für 60-90 min innerhalb des Trenngels.

2.3.4 Immunoblot

Der Transfer von Proteinen aus dem Acrylamid-Gel auf eine Trägermembran wird als (Western-)Blotting bezeichnet. Die membrangebundenen Proteine lassen sich immunologisch über den Einsatz von Antikörpern nachweisen. Dabei bindet ein Primärantikörper spezifisch an sein entsprechendes Proteinantigen auf der Membran. Ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. In Gegenwart von luminophorenhaltiger (Entwickler-)Lösung katalysieren sekundärantikörpergekoppelte Enzyme eine Chemilumineszenzreaktion, welche sich in Form von Signalbanden visualisieren und semiquantitativ bestimmen lässt (Towbin et al. 1979).

Die separierten Proteine wurden im Folgenden mittels Elektrophorese im Nassverfahren/Tank-Blotting auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA85, Whatman/GE Healthcare) übertragen. Hierfür wurde das *Mini Trans-Blot Cell System* (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. Das proteintragende Trenngel wurde nach Entfernung des Sammelgels vorsichtig auf eine Nitrocellulosemembran überführt und gemeinsam mit Chromatographiepapier (Whatman 3MM, GE Healthcare) und Schwämmen (Bio-Rad) in eine Blottingkassette (Bio-Rad) geklemmt. Die Blottingkassette wurde in das Blottingmodul (Bio-Rad) gespannt, welches danach in die mit eiskaltem Transfer-Puffer (siehe Kap. 2.7.3) gefüllte Blottingkammer (Bio-Rad) gesetzt wurde. Nach Hinzugabe eines Kühlmoduls (Bio-Rad) wurde die Blottingkammer in eine Eiswanne gesetzt. Es wurde ein konstanter Gleichstrom von 400 mA für 90 min angelegt. Zur Transferkontrolle wurden die transferierten Proteine mit einer Ponceau S-Lösung (siehe Kap. 2.7.3) gefärbt. Sodann wurde die Membran vollständig mittels TBS-T (siehe Kap. 2.7.3) entfärbt und zur Blockung unspezifischer Wechselwirkungen mit den Antikörpern in 5%iger Milchpulver-Lösung (5% MP) bei RT für 2 h inkubiert. Für den Nachweis von I-1 oder Proteinen des PathScan[®] Antikörper-Mix (Cell Signaling) wurde die Membran in 5%igem Rinderalbumin (5% BSA) bei 4 °C über Nacht geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Kap. 2.8.1, Tab. 5) erfolgte bei 4 °C über Nacht auf der Kippwippe (*Rocking Platform WT15*, Biometra). Anschließend wurde die Membran viermal mit TBS-T für jeweils 7 min gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper (siehe Kap. 2.8.1, Tab. 6) inkubiert. Hiernach wurde die

Membran viermal für je 15 min in TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*, Pierce) oder Dura-Substrat (*SuperSignal West Dura Chemiluminescent*, Pierce) wurde zur Sichtbarmachung der Proteinbanden gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals erfolgte mit dem *Molecular Imager[®] VersaDocTM MP 4000 System* (Bio-Rad). Zur quantitativen Auswertung wurde die *Quantity One[®] 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) benutzt.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Es wurden mit Deckgläsern (rund, Marienfeld) bestückte 12-Well-Platten (Nunc) mit nRFB der ersten Passage (ca. 12.500 – 15.000 Zellen / Deckglas und Vertiefung) besät. Die Zellen wurden im Fibroblasten-Medium im Inkubator (*Steri-Cult 200 Incubator*, Forma Scientific) für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die adenovirale Transduktion der Zellen mit (i) Ad-I-1, (ii) Ad-I-1c oder (iii) Ad-eGFP (siehe Kap. 2.1.8). Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurde der Erfolg der Transduktion unter einem Fluoreszenzmikroskop (*Axiovert 200*, Zeiss) kontrolliert.

Die vorbehandelten Fibroblasten wurden vom Medium befreit und zweimal für 2 min in 1 ml PBS (37 °C, Gibco) gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 150 µl Roti[®]-Histofix (4%, Roth) bei RT für 3 min inkubiert, zweimal in 1 ml PBS für 2 min gewaschen und anschließend mit einem Permeabilisierungs- und Blockierungspuffer (siehe Kap. 2.7.4) bei RT für 30 min permeabilisiert und blockiert. Der Waschvorgang mittels PBS wurde wiederholt. Zur Färbung von *α-smooth muscle actin* wurde der anti- α -SMA-Antikörper (Sigma-Aldrich) in Antikörper-Lösungspuffer (1:100) verdünnt. Nach Entfernung des PBS wurden die vorbehandelten Fibroblasten mit 200 µl des verdünnten Primärantikörpers pro Well bei RT und für 1 h inkubiert und wiederholt zweimal in PBS gewaschen. Danach wurde eine Zweitantikörper-Farbstoff-Lösung, bestehend aus (i) dem jeweiligen fluorchromgekoppelten Zweitantikörper *Alexa Fluor[®] 546-anti-mouse* (1:500 in Antikörper-Lösungspuffer verdünnt, Invitrogen) sowie (ii) *Alexa Fluor[®] 633-Phalloidin* (1:40 in Antikörper-Lösungspuffer, zur Färbung der Aktin-Filamente, Invitrogen) und (iii) DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1:1.000 in Antikörper-Lösungspuffer, zur Färbung der Zellkerne, Invitrogen), unter Lichtentzug herge-

stellt und vorsichtig invertiert. Die Zellen wurden danach mit 200 µl der Zweitantikörper-Farbstoff-Lösung bei RT und unter Lichtentzug für 1 h inkubiert. Sodann wurden die Fibroblasten von der Zweitantikörper-Farbstoff-Lösung befreit und zweimal in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Deckgläser vorsichtig im Dunkeln aus den 12-Well-Platten gehoben, mit der zellbeschichteten Oberfläche in Bodenrichtung auf die beschrifteten Objektträger gelegt und mit *Fluoromount-GTM* (1 Tropfen, SouthernBiotech) fixiert. Die Objektträger wurden bei RT und unter Lichtentzug für 24 h getrocknet. Anschließend wurde die Färbung fluoreszenzmikroskopisch unter dem Konfokalmikroskop (LSM 710 NLO, Zeiss) analysiert.

2.5 Fluoreszenzmarkierte Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzmarkierte Durchflusszytometrie ist ein komplexes Verfahren zur Quantifizierung und Analyse unterschiedlicher Zellcharakteristika (z. B. relative Größe, relative Zellgranularität, relative Fluoreszenzintensität). Hierbei fließen einzelne Zellen in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch einen Laserstrahl und streuen gemäß ihrer Zellcharakteristika das Licht. Durch Wellenlänge des Laserlichtes (gemäß der Absorptionsspektren) angeregte fluoreszenzmarkierte Zellen emittieren in Abhängigkeit von ihrer Anregung Licht längerer Wellen (Emissionsspektrum). Optische Filter und Detektoren erfassen das gestreute oder emittierte Licht, welches über eine optisch-elektronische Schnittstelle proportional zur Intensität in elektronische Signale umgewandelt wird. Diese können am Computer analysiert oder weiter bearbeitet werden. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (*forward-scattered light*, FSC) proportional zur Zelloberfläche bzw. zur Zellgröße und Seitwärtsstreulicht (*side-scattered light*, SSC) proportional zur Zellgranularität. Bei ähnlichen Absorptionsspektren und nicht zu nah bei einander liegenden maximalen Emissionswellenlängen können mehrere Fluorochrome simultan durch einen Laser angeregt und später analysiert werden. Die Kombination von Fluoresceinisothiocyanat (FITC, maximale Emissionswellenlänge von 530 nm) und Phycoerythrin (PE, maximale Emissionswellenlänge von 570) erfüllt diese Kriterien und findet im folgendem Versuch Anwendung (Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, BD Biosciences).

Auf 6-Well-Platten adhären Ad-I-1c-, Ad-eGFP-transduzierte sowie unbehandelte nRFB (P1) wurden mit Trypsin (2 ml pro Well) für 6 min inkubiert, um sie von der Oberfläche zu lösen. Das Trypsin wurde durch die Hinzugabe von Fibroblasten-Medium (4 ml pro Vertiefung) antagonisiert. Die gelösten Zellen wurden in ein 10-ml-Sammelgefäß (Eppendorf) überführt, bei 4 °C und 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert (*Centrifuge 5804 R*, Eppendorf) und anschließend vom Überstand befreit. Das Zellpellet wurde in 4 ml 70% Ethanol behutsam resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Die folgenden Schritte wurden unter Kühlung der Zellen auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden bei 4 °C und 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert, das Ethanol wurde entfernt und die Zellpellets in Blockierungspuffer (800 µl pro Pellet) resuspendiert. Davon wurden wiederum 200 µl in je eine Well einer 48-Well-Platte (mit rundlichem Boden, Nunc) überführt. Die 48-Well-Platten wurden bei 4 °C und 300 g für 4 min zentrifugiert. Nach Entfernen der Pufferlösung wurden die Pellets mit 50 µl Antikörperlösung (anti-Col1, 1:5.000 in Blockierungspuffer) versetzt. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig Zellpellets mit 50 µl einer IgG1-Protein-Lösung (*Mouse IgG1 Isotype Control*, 1:100 in Blockierungspuffer) versetzt. Die Platten wurden nun behutsam per Hand für 5 min geschüttelt und anschließend für 45 min auf Eis inkubiert. Sodann wurden 150 µl des Puffers pro Well hinzugegeben und die Platten bei 4 °C und 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut mit 200 µl Puffer vermischt. Nach manuellem Schütteln der Platte für 2 min wurde die Zentrifugation wiederholt und der Überstand entfernt. Nun wurden 50 µl der Zweitantikörper-Farbstoff-Lösung (*Alexa Fluor[®] 546-anti-mouse*, Hoechst 33342, jeweils 1:1.000 in Blockierungspuffer) in jedes Well gegeben und unter Lichtentzug auf Eis für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µl Puffer hinzugegeben, erneut zentrifugiert (4 °C, 1.000 rpm, 5 min) und der Überstand entfernt. Die Zentrifugation wurde nach Resuspension der Pellets in 200 µl Puffer wiederholt. Im letzten Schritt wurden die Zellpellets in 200 µl eiskaltem PBS aufgenommen, in Messgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer BDTM LSR II (BD Biosciences) unter Verwendung der BD FACSDiva Software.

2.6 Statistische Auswertung

Die Präsentation der Daten erfolgt als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Die Datensätze wurden entsprechend dem experimentellen Aufbau entweder mit Student's *t*-Test oder One-way ANOVA gefolgt von XY-Posttest verglichen. Als signifikant wurden p-Werte $<0,05$ gewertet. Die Analyse der Daten und die Erstellung von Graphen erfolgte unter Verwendung der *Prism 5 Software* (GraphPad).

2.7 Medien, Puffer und Lösungen

2.7.1 Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Medien:

NKM-Medium (Nicht-Kardiomyozyten-Medium)

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM, 1 g/l Glukose, 3,7 g/l NaHCO₃, Katalog# F0415, Biochrom)

FCS, inaktiviert	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin (P/S) 100x	1% (v/v)
L-Glutamin	1% (v/v)

KM-Medium (Kardiomyozyten-Medium)

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM, 1 g/l Glukose, 3,7 g/l NaHCO₃, Katalog# F0415, Biochrom)

FCS, inaktiviert	10% (v/v)
BrdU	1% (v/v)
P/S 100x	1% (v/v)

Fibroblasten-Medium

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM, 4,5 g/l Glukose, + L-Glutamin, Katalog# 61965, Gibco)

FCS, inaktiviert	10%
P/S 100x	1%
MEM NEAA 100x	1%

Interventionsmedium

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM 1 g/l Glukose, + Pyruvat, Katalog# 21885, Gibco)

P/S 100x	1%
----------	----

Transduktionsmedium

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM, 4,5 g/l Glukose, + L-Glutamin, Katalog# 61965, Gibco)

MEM NEAA	1%
P/S 100x	1%

Zellisolation:**CBFHH (Calcium- und Bikarbonatfreier Hanks-Puffer mit HEPES)**

NaCl	136,9 mM
MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)	0,81 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄ (x 7 H ₂ O)	0,34 mM
Glucose	5,55 mM
HEPES	20 mM

Hergestellt aus autoklavierten oder sterilfiltrierten Stammlösungen. Auf pH 7,5 eingestellt und sterilfiltriert, gelagert bei 4 °C.

Trypsin-Stammlösung

100 mg Trypsin pro ml CBFHH, rotierend bei 4 °C ü. N. gelöst, sterilfiltriert.
Gelagert bei -20 °C.

DNase-Stammlösung

1 mg DNase I, Typ V pro ml H₂O, sterilfiltriert. Gelagert bei -20 °C.

Trypsin-Arbeitslösung

Trypsin-Stammlösung		1,3 ml
DNase-Stammlösung		0,2 ml
P/S 100x		0,5 ml
CBFHH, frisch hergestellt, auf Eis gelagert	ad	50 ml

DNase-Arbeitslösung

DNase-Stammlösung		0,2 ml
FCS, inaktiviert		1,7 ml
P/S 100x		0,5 ml
CBFHH, frisch hergestellt, auf Eis gelagert	ad	50 ml

2.7.2 Medien, Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden**RNA-Isolation:****RNA-Lyse-Puffer (Promega)**

GTC	4 M
Tris-Base (pH 7,5)	10 mM
β-Mercaptoethanol	0,97%

RNA-Waschlösung (Promega)

Kaliumacetat	60 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
Ethanol	60%

Yellow Core Buffer (Promega)

Tris (pH 7,5)	22,5 mM
NaCl	1,125 M
Yellow Dye	0,0025%

MnCl₂ (Promega)

9 mM

DNase-Stop-Lösung (Promega)

GTC	2 M
Tris-HCl (pH 7,5)	4 mM
Ethanol	57%

DNase-Inkubationspuffer (Promega)

Yellow Core Buffer	40 µl
MnCl ₂ (0,09 M)	5 µl
DNase I Enzym	5 µl

Gelelektrophorese (DNA):**TAE-Puffer (50x)**

Tris	2 M
Essigsäure	5,7% (v/v)
EDTA	0,05 M

2.7.3 Medien, Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Proteinisolation:

RIPA-Lysepuffer

NaCl	150 mM
Tris-HCl	30 mM
SDS	0,15%
NP-40	1%
EDTA	1 mM
PhosSTOP® (Phosphataseinhibitor, Roche)	nach Gesamtvolumen
cOmplete® (Proteaseinhibitor, Roche)	nach Gesamtvolumen

SDS-PAGE:

Puffer nach Laemmli (1970), 6x konzentriert

SDS	2%
Bromphenolblau	0,01%
Glycerol	10%
Tris-HCl (pH 6,8)	10 mM
DTT (Dithiothreitol)	100 mM
<i>Aqua bidest.</i>	ad. 10 ml

Trenngel (12%)

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 29:1	10-15%
Tris-Base (pH 8,8)	375 mM
SDS	0,1%
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1%
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid (TEMED)	0,03%

Sammelgel (5%)

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung: 29:1	5%
Tris-Base (pH 6,8)	125 mM
SDS (10%)	0,1%
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1%
TEMED	0,08%

Laufpuffer

Glycin	192 mM
Tris-Base	25 mM
SDS	0,1%

Immunoblot:**Transfer-Puffer**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	42 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (pH 7,4)	8 mM

TBS-T Puffer

Tris-Base (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

Ponceau S-Lösung

Ponceau S	0,2%
Trichloressigsäure	3%
5-Sulfosalicylsäure	3%

Immunfluoreszenzfärbung:**Permeabilisierungs- und Blockierungspuffer**

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	0,2%
BSA	1%
Ziegenserum	5%

Antikörper-Lösungspuffer

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	0,5%
BSA	1%
MgCl_2	1 mM
EGTA	0,1 mM

2.7.4 Puffer für die Probenvorbereitung zur Durchflusszytometrie

Blockierungspuffer

PBS (pH 7,2 – 7,4)	
FBS	5%
BSA	1%
Triton-X100	0,5%

2.8 Material

2.8.1 Antikörper

1. Antikörper	Verdünnung	Firma/Referenz	2. Antikörper	Verdünnung
α -SMA (mk)	1:2.000 (TBS-T)	Sigma-Aldrich	anti-m-IgG-POX Alexa Fluor [®] 546- anti-mouse	1:20.000
c-myc (pk)	1:1.000 (TBS-T)	Sigma-Aldrich	anti-r-IgG-POX	1:1.000
Col1 (pk)	1:5.000 (BP), 1:10.000 (BP)	Abcam [®]	Alexa Fluor [®] 546- anti-mouse	1:1.000
CREB (mk)	1:1.000 (BSA)	Cell Signaling	anti-r-IgG-POX	1:2.000
CSQ (pk)	1:2.500 (TBS-T)	Thermo Scientific	anti-r-IgG-POX	1:5.000
CTGF (pk)	1:200 (TBS-T)	Santa Cruz	anti-g-IgG-HRP	1:10.000
DARPP-32 (pk)	1:2.000 (BSA)	Cell Signaling	anti-r-IgG-POX	1:10.000
I-1 (pk)	1:1.000 (TBS-T)	El-Armouche <i>et al.</i> 2003 a	anti-r-IgG-POX	1:5.000
GAPDH (mk)	1:500 (TBS-T)	Santa Cruz	anti-m-IgG-POX	1:10.000
PathScan [®] (pk)	1:500 (BSA)	Cell Signaling	anti-r-IgG-POX	1:2.000
P-CREB (mk)	1:1.000 (MP)	Cell Signaling	anti-m-IgG-POX	1:5.000
Pro-Col1a1 (pk)	1:500 (TBS-T)	Santa Cruz	anti-r-IgG-POX	1:5.000

Tab. 5: Antikörper: Verwendete Primärantikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Immunoblot. Abkürzungen: monoklonal (mk); polyklonal (pk); in einer 5%igen BSA-Lösung gelöst (BSA); in einer 5%igen Milchpulver-Lösung gelöst (MP); in TBS-T-Puffer gelöst (TBS-T); anti-Ziege (anti-g); anti-Maus (anti-m); anti-Kaninchen (anti-r); Immunglobulin G (IgG); Meerrettich-Peroxidase-konjugiert (-HRP); Peroxidase-gekoppelt (-POX).

2. Antikörper	Verdünnung	Firma/Referenz
Alexa Fluor® 546-anti-mouse	1:500 (Antikörper-Lösungspuffer)	Invitrogen
Alexa Fluor® 546-anti-rabbit	1:500 (Antikörper-Lösungspuffer)	Invitrogen
anti-g-IgG-HRP	siehe Tab. 5 (MP)	Santa-Cruz
anti-m-IgG-POX	siehe Tab. 5 (MP)	Sigma-Aldrich
anti-r-IgG-POX	siehe Tab. 5 (MP)	Jackson ImmunoResearch

Tab. 6: Verwendete Sekundärantikörper zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung und zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Immunoblot. Abkürzungen: in einer 5%igen Milchpulver-Lösung gelöst (MP); anti-Ziege (anti-g); anti-Maus (anti-m); anti-Kaninchen (anti-r); Immunglobulin G (IgG); Meerrettich-Peroxidase-konjugiert (-HRP); Peroxidase-gekoppelt (-POX).

2.8.2 Primer, cDNA-Synthese und PCR-Programme

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Primer	Primersequenz (5'-3')
m_l-1-for	5'-CCA CGG AAG ATC CAG TTT ACG-3'
m_l-1-rev	5'-GAC TGA TCA CTG GTC AGC ACA A-3'
r_l-1-for	5'-CGG CCA TGG AGC CCG ACA AC-3'
r_l-1-rev	5'-TGC CTC CGG GTC CAG GTG AG-3'
hu_l-1-for	5'-CAT GGA GCA AGA CAA CAG CCC-3'
hu_l-1-rev	5'-TGG AAT CCA GTG GTG GTA TAT GG-3'
m_GAPDH-for	5'-ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G-3'
m_GAPDH-rev	5'-GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A-3'
r-GAPDH-for	5'-ATG TTC CAG TAT GAC TCT ACC CAC G-3'
r-GAPDH-rev	5'-GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A-3'
hu_GAPDH-for	5'-ATG TTC GTC ATG GGT GTG AA-3'
hu_GAPDH-rev	5'-TGA GTC CTT CCA CGA TAC CA-3'

Tab. 7: Primer und ihre Sequenzen. Es wurden speziesspezifische Primer verwendet. **Abkürzungen:** Maus (m); Ratte (r); Mensch (hu); Vorwärts-Primer (-for); Rückwärts-Primer (-rev); Adenin (A); Cytosin (C); Guanin (G); Thymin (T).

Reverse Transkription:

Es wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Substanz	Volumen (μl)
10x RT Puffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT oligo(dT) Primer	2
<i>MultiScribeTM Reverse Transcriptase</i>	1
RNase Inhibitor	1
Nukleasefreies H ₂ O	3,2

Tab. 8: Reverse Transkription. Ansatz zur Herstellung des *Mastermix*.

Substanz	Volumen (μl)
10x RT Puffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT oligo(dT) Primer	2
<i>MultiScribeTM Reverse Transcriptase</i>	-
RNase Inhibitor	1
Nukleasefreies H ₂ O	4,2

Tab. 9: Reverse Transkription. Reaktionsansatz zur Herstellung des *Mastermix* für die Negativkontrolle.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (min)	10	120	5	∞

Tab. 10: Reverse Transkription. Thermozyklerprogramm für cDNA-Synthese.

Quantitative Echtzeit-PCR

Es wurde der *Maxima*[®] SYBR Green/ROX qPCR Mastermix gemäß Herstellerangaben verwendet (Thermo Scientific) verwendet.

Substanz	Volumen (µl)
Vorwärtsprimer (900 nM)	0,9
Rückwärtsprimer (900 nM)	0,9
<i>Master Mix</i>	5
Nukleasefreies H ₂ O	2,2
cDNA	1

Tab. 11: Quantitative Echtzeit-PCR. Reaktionsansatz.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen (Anzahl)
Denaturierung	95	10:00	1
Denaturierung	95	00:15	40
Primerhybridisierung	60	00:30	
Elongation	72	00:30	

Tab. 12: Quantitative Echtzeit-PCR. Thermozyklerprogramm.

Klassische PCR

Es wurde der *GoTaq*[®] Green Master Mix gemäß Herstellerangaben (Promega) verwendet.

Substanz	Volumen (µl)
Vorwärtsprimer (900 nM)	1
Rückwärtsprimer (900 nM)	1
<i>GoTaq</i> [®] Green Master Mix	12,5
Nukleasefreies H ₂ O	8,5
cDNA	2

Tab. 13: Klassische PCR. Reaktionsansatz.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min: sec)	Zyklen (Anzahl)
Denaturierung	94	03:00	1
Denaturierung	94	00:30	30
Primerhybridisierung	56	00:30	
Elongation	72	02:30	
Kühlung	4	∞	-

Tab. 14: Klassische PCR. Thermozyklerprogramm.

2.8.3 Substanzen

1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	AppliChem
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (37,5:1)	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Alexa Fluor® 633-Phalloidin	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (10%)	Bio-Rad
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun
Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	Bachem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor cOmplete®	Roche
DAPI	Invitrogen
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth
DMEM, Katalog# 21885	Gibco
DMEM, Katalog# 61965	Gibco
DMEM, Katalog# F0415	Biochrom
DNase I, <i>Bovine Pancreas</i>	Calbiochem
<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Pierce
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-	
N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
<i>Fluoromount-G™</i>	SouthernBiotech
Glucose	AppliChem
Glycerol	AppliChem
<i>GoTaq® Green Master Mix</i>	Promega
HEPES	Roth
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems
Hochest 33342	Invitrogen
Hydrochloridsäure (HCl)	Roth
Isoprenalin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck

Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
L-Glutamin	Gibco
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem
Magnesiumsulfathexahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck
MEM, NEAA	Gibco
Methanol	Roth
<i>Mouse IgG1 Isotype Control</i>	R&D Systems™
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nitroprussid-Natrium	Roth
PBS	Gibco
Pen-Strep, 100x	Gibco
<i>PhosSTOP®</i>	Roche
Ponceau S-Lösung	AppliChem
<i>Precision Plus Standard™, All Blue</i>	Bio-Rad
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rinder-Immunglobulin G	Sigma-Aldrich
Roti®-Histofix 4%	Roth
Roti®-Nanoquant (5x Konzentrat)	Roth
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific
SV Total RNA Isolation System Kit	Promega
SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Bio-Rad
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-Base	AppliChem
Triton X-100	Roth
Trypan-Blau	AppliChem
Trypsin 250 Dicto™	BD Biosciences
Trypsin-EDTA	Gibco
Polyoxyethylene (29) sorbitan monolaurate (Tween® 20)	Sigma-Aldrich

Ziegenserum

Sigma-Aldrich

2.8.4 Hilfsmittel und Geräte

Analytikwaage	Sartorius AG
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Biosphere [®] Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
Chromatographiepapier (Whatman 3 MM)	GE Healthcare
Deckgläser Stärke 1, rund	Marienfeld
Digitalwaage	Sartorius AG
Durchflusszytometer BDTM LSR II	BD Biosciences
Einwegspritzen Injekt 10 ml, 20 ml	B. Braun
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad
Elektrophorese-Spannungsgerät <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad
Elektrophorese-System (<i>Mini Protean[®] electrophoresis cell</i>)	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiocvert 200</i> mit Kamera	Zeiss
Gewebekulturplatten 6-Well, 12-Well	Nunc
Kippwippe <i>Rocking Platform WT15</i>	Biometra
Konfokales Mikroskop LSM 710 NLO	Zeiss
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Megafuge 3.0 R</i>	Hereaus
Küvetten (10 x 4 x 45)	Sarstedt
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RET	Ika Labortechnik
Mikroplattenleser <i>FlexStation 3</i>	Molecular Device
<i>Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR Imaging System</i>	Bio-Rad
<i>Molecular Imager[®] VersaDoc[™]</i>	
<i>MP 4000 Imaging System</i>	Bio-Rad
Nitrocellulosemembran Protran BA85	Whatman/GE Healthcare
PCR-Gefäße	Eppendorf
PCR-Thermozykler <i>Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler</i>	Applied Biosystems
pH-Meter	Denver Instrument

Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetten, serologisch 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon
Pipetten, serologisch, weitlumig 10 ml	Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Echtzeit-PCR-Gerät <i>7900 HT Fast Real Time PCR System</i>	Applied Biosystems
Sammelgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner-Bio-One
Spectrophotometer <i>NanoDrop 1000</i>	Thermo Scientific
<i>SuperFrost</i> [®] Objektträger	GerhardMenzel GmbH
Vortex Schüttler VF2	IKA Labortechnik
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Wärmeschüttler <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf
Wippender Plattformschüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph
Zählkammer <i>Neubauer-improved</i>	Laboroptik
Zellinkubator <i>Steri-Cult 200 Incubator</i>	Forma Scientific
Zellkulturschalen 10 cm, 15 cm	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

3 Ergebnisse

3.1 Proteinanalytische Untersuchung zur Anreicherung isolierter kardialer Primärzellen aus neonataler Maus und Ratte

Die für die nachfolgenden Versuche verwendeten kardialen Primärzellkulturen wurden über seriellen Trypsinverdau neonataler Mausherzen oder Rattenventrikel isoliert. Durch dieses Verfahren lassen sich sowohl vitale Fibroblasten als auch Kardiomyozyten gewinnen. Nach der Zellisolierung wurden die beiden Zellpopulationen anhand ihrer Adhäsionseigenschaften via *Pre-Plating* separiert. Überwachung der isolierten Kardiomyozyten durch proliferierende Zellen sollte durch 5-Brom-2'-deoxyuridin-haltiges (BrdU, AppliChem) Medium (KM-Medium) verhindert werden. Um die Effizienz des Trennverfahrens zu überprüfen, wurden Immunoblots mit Lysaten aus nMFB und nMKM bzw. nRFB und nRKM durchgeführt. Es wurde die Expression von Calsequestrin (CSQ), einem kardiomyozytenspezifischen Sarkomerprotein, als Marker für Kardiomyozyten (Maurer 2009) und die Expression von Pro-Kollagen Typ 1 (Pro-Col1 α 1) als Marker für Fibroblasten (Kalluri und Zeisberg 2006) analysiert. Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen in den verwendeten Proteinisolaten und Fehlbeladungen bei der Durchführung der Gelelektrophorese ausschließen zu können, wurde zusätzlich die Expression des ubiquitär exprimierten Stoffwechselenzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) untersucht.

In den Fibroblastenkulturen der neonatalen Ratte ließ sich erwartungsgemäß eine deutliche Pro-Col1 α 1-Expression und nur eine minimale CSQ-Expression nachweisen, während umgekehrt die nRKM-Fractionen eine hohe CSQ-Expression und eine nur schwache Expression von Pro-Col1 α 1 aufwiesen. Auch nMKM und nMFB zeigten, wie erwartet, eine entsprechende Verteilung der Markergene. Allerdings schien hier eine höhere Verunreinigung mit Kardiomyozyten in der Fibroblastenfraction vorzuliegen (siehe Abb. 4). Insgesamt wurde durch die Methode des *Pre-Platings* und durch die gezielte Zugabe des Proliferationsinhibitors BrdU in KM-Kulturen eine Anreicherung der gewünschten Zellpopulation erzielt.

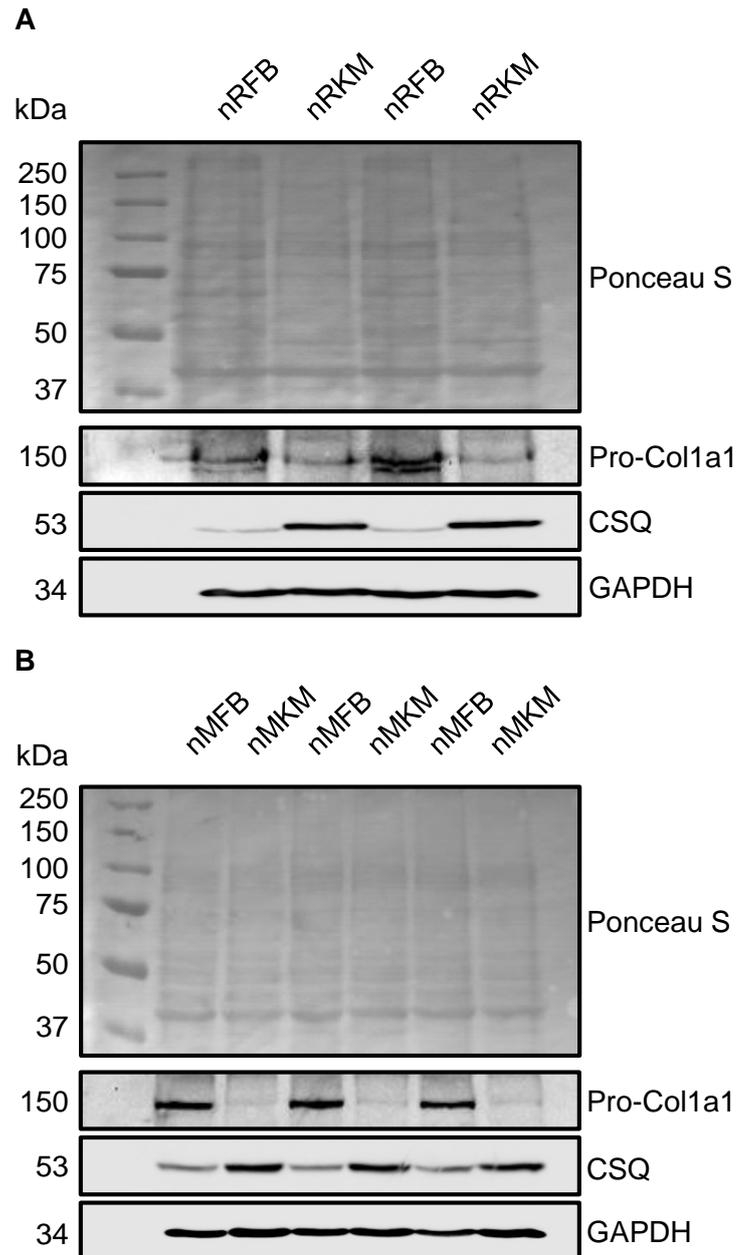


Abb. 4: Proteinanalytische Untersuchung zur Anreicherung primärer kardialer Fibroblasten und Kardiomyozyten aus neonataler Maus und Ratte. Neonatale Fibroblasten (P1) wurden bis zur Konfluenz von 70-90% und neonatale Kardiomyozyten der gleichen Präparation bis zur Adhärenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 150 μ l Lyse-Puffer pro Well einer 6-Well Platte lysiert, um die Expression der Markergene Calsequestrin (anti-CSQ) und Prokollagen α 1 Typ I (anti-Pro-Col1 α 1) zu untersuchen. (A) Immunoblot aus Lysaten von nFB und nKM aus Ratten und (B) Mäusen. Zur Beladungskontrolle wurde die Ponceau S-Färbung und GAPDH-Expression (anti-GAPDH) dargestellt.

3.2 Expression des endogenen Inhibitor-1 in kardialen Zellpopulationen aus neonatalen Mäusen und Ratten

Endogener I-1 wird in einer Vielzahl von Säugetiergeweben exprimiert (Elbrecht et al. 1990, MacDougall et al. 1989). So konnte seine Expression auch in kardialem Gewebe nachgewiesen werden (Iyer et al. 1988, Neumann et al. 1991). In welchem Verhältnis sich die Expression von I-1 auf kardiale Fibroblasten und Kardiomyozyten verteilt, ist hingegen nicht bekannt. Um dieses zu untersuchen, wurde die I-1-Transkription mittels quantitativer PCR in Mauszellen (nMFB und nMKM) und in Rattenzellen (nRFB und nRKM) analysiert. Anschließend wurde die I-1-Transkription der neonatalen Fibroblastenpopulationen mit der I-1-Transkription adulter humaner kardialer Fibroblasten (aHuFB) aus dem Ventrikel, isoliert von Herrn Dr. med. Malte Tiburcy (Abteilung Pharmakologie und Toxikologie im Herzzentrum Göttingen), in der quantitativen PCR verglichen (siehe Abb. 5). Es wurden speziesspezifische Primer verwendet (siehe Kap. 2.8.2, Tab. 7).

In nRKM ließ sich die Tendenz ($p=0.06$) zur höheren I-1-Transkription im Vergleich zu nRFB nachweisen (Abb. 3.2.A), welches die Bedeutung der β -adrenergen Signaltransduktion in Kardiomyozyten für die Herzfunktion widerspiegelt. In neonatalen Mäusen hingegen zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis, verglichen mit nMKM wird endogener I-1 deutlich stärker in nMFB transkribiert (Abb. 3.2.B). Im Unterschied zu neonatalen Fibroblasten aus Ratte und Maus ließ sich endogener I-1 in kultivierten kardialen Fibroblasten aus adultem Humangewebe kaum nachweisen (Abb. 3.2.C).

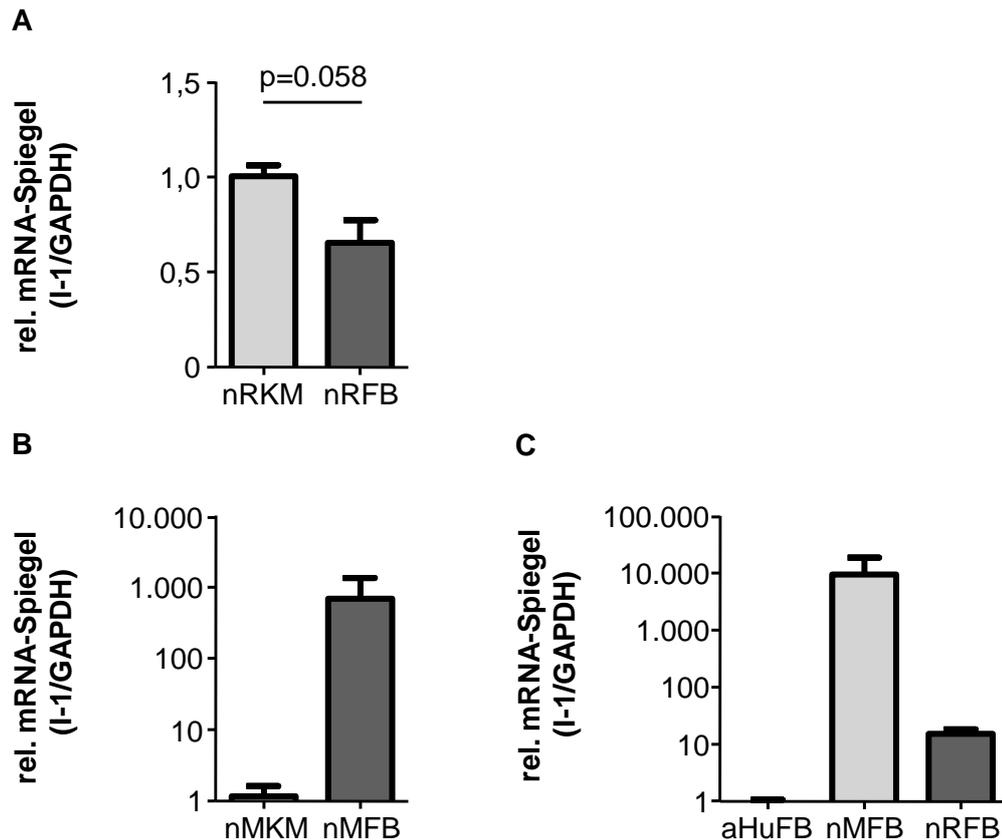


Abb. 5: mRNA-Expression des endogenen Inhibitor-1 in kardialen Fibroblasten aus neonatalen Mäusen, Ratten und adulten Menschen. Echtzeit-Daten zum Vergleich der endogenen I-1-Expression zwischen nFB, nKM und aHuFB auf mRNA-Ebene. cDNA aus kardialen nMFB (P1), nRFB (P1) und kultivierten kardialen aHuFB wurde mit spezifischen Primerpaaren für I-1 und GAPDH via quantitativer PCR amplifiziert. Die I-1-Transkription wurde unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel auf GAPDH normalisiert und relativ zur Transkription in nRKM (A), nMKM (B) oder aHuFB (C) dargestellt. $n=3$ je Gewebetyp und Spezies, gemessen in 3 Replikaten. Statistische Signifikanz mit Student's *t*-Test (A, B) und One-way ANOVA gefolgt von *Dunnnett's Posttest* (C).

3.2.1 Expression des endogenen Inhibitor-1 in kardialen Zellpopulationen der adulten Maus

In Anlehnung an die vorherigen Ergebnisse wurde nun innerhalb der Spezies Maus untersucht, ob sich das Expressionsmuster des endogenen I-1 zwischen neonatalen und adulten Tieren unterscheidet. Hierfür wurde zunächst in einem Vorversuch I-1 in adulten kardialen Mausfibroblasten (aMFB) und adulten Mauskardiomyozyten (aMKM) in der qualitativen PCR analysiert (siehe Abb. 6A). Das Ergebnis zeigte sowohl in aMFB als auch in aMKM I-1-Amplifikate, wobei sich eine deutlich erhöhte Intensität der Banden in aMKM zeigte. Anschließend wurde das Ergebnis in der quantitativen PCR verifiziert (siehe Abb. 6B). Die verwendeten

Primer, Ansätze und Zyklusprogramme sind im Kap. 2.8.2 aufgeführt. Die umgeschriebene cDNA wurde von Frau Simin Chen (M.Sc., Abteilung Pharmakologie und Toxikologie im Herzzentrum Göttingen) bereitgestellt.

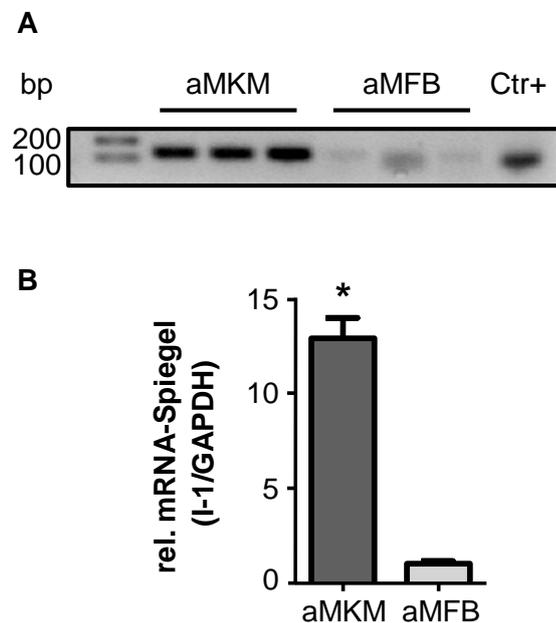


Abb. 6: PCR und Echtzeit-Daten zum Vergleich der endogenen I-1-Expression zwischen aMFB und aMKM auf mRNA-Ebene. cDNA aus kardialen aMFB und aMKM wurde mit spezifischen Primerpaaren für I-1 via Endpunkt-PCR und qualitativer PCR amplifiziert. (A) Amplifiziertes I-1-Fragment mittels Endpunkt-PCR. Als Positivkontrolle diente rekombinantes I-1 in pcDNA. (B) Quantifizierung der Echtzeit-Daten. Die I-1-Transkription wurde unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel auf GAPDH normalisiert und relativ zur Transkription in aMKM dargestellt. n=3 je Gewebetyp. Statistische Signifikanz mit Student's *t*-Test. * $p < 0,05$.

Bezogen auf die Ergebnisse der I-1-Transkriptionsanalyse in neonatalen Mauszellen (siehe Kap. 3.2) zeigte sich in adulten Tieren ein gegenteiliges Expressionsmuster. Die quantitative PCR bestätigte das vorherige Ergebnis, es ließ sich eine signifikant höhere Anzahl an I-1-Transkripten in aMKM (ca. um Faktor 13) im Vergleich zu aMFB nachweisen. Dieses Ergebnis passt gut zu unseren Daten aus aHuFB, in welchen sich I-1 nur marginal detektieren ließ. Betrachtet man die funktionelle Relevanz des β -adrenergen Signalweges in adulten, differenzierten KM, ist es nicht verwunderlich, dass I-1 als Verstärkerelement dieses Signalweges stärker in KM exprimiert wird.

3.3 Überprüfung der Zellkulturbedingungen nach Serumentzug

Neonatale kardiale Fibroblasten (P0 und P1) wurden in FCS-haltigem (10% FCS) Medium und unter Hochglukosebedingungen kultiviert. Die Supplementierung des Mediums mit einer relativ hohen Konzentration an FCS und Glukose sollte den Fibroblasten proliferationsfördernde Zellkulturbedingungen bereit stellen (Scholz 2009). Goppelt-Struebe *et al.* zeigten 2001 jedoch, dass hohe Konzentrationen an FCS eine verstärkte Expression des Fibrose-assoziierten Proteins CTGF induzierte (Goppelt-Struebe *et al.* 2001). Um die Auswirkung isolierter Stimuli wie die Aktivierung oder Verstärkung der β -adrenergen Signalkaskade auf Fibroblasten in Folgeversuchen untersuchen zu können, mussten mögliche FCS-vermittelte Effekte ausgeschlossen werden. Daher wurden die Fibroblasten 3 h vor ihrer weiteren Verwendung vom Serum befreit, dreimal in PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium mit Niedrigglukose (Interventionsmedium) kultiviert. Zur Überprüfung, inwieweit die gewählten Kulturbedingungen geeignet sind, pro- oder antifibrotische Effekte auf Proteinebene zu detektieren, wurde zunächst die Auswirkung des bekannt antifibrotisch wirkenden *second messengers* cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Redondo *et al.* 1998) auf die kultivierten Fibroblasten untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit den Substanzen atriales natriuretisches Peptid (ANP, 1 μ M) und Nitroprussid-Natrium (SNP, 40 μ M) für 24 h stimuliert. ANP und SNP ist die intrazelluläre Generierung von cGMP gemein. ANP bindet an eine extrazelluläre Bindungsdomäne der membranständigen Guanylylcyclase-A (GC-A) und aktiviert diese, wodurch letztlich die cGMP-Synthese induziert wird (Ogawa *et al.* 2004, Potter 2005). SNP hingegen ist ein Stickstoffmonoxid-Donor (NO-Donor) (Hirai *et al.* 2013). Das freigesetzte NO bindet und aktiviert die intrazelluläre lösliche Guanylylcyclase, welche im aktivierten Zustand cGMP synthetisiert (Mitrovic *et al.* 2011). Anschließend wurde die Expression des Myofibroblasten-Markers α -SMA im Immunoblot (Hinz 2007) untersucht (siehe Abb. 7).

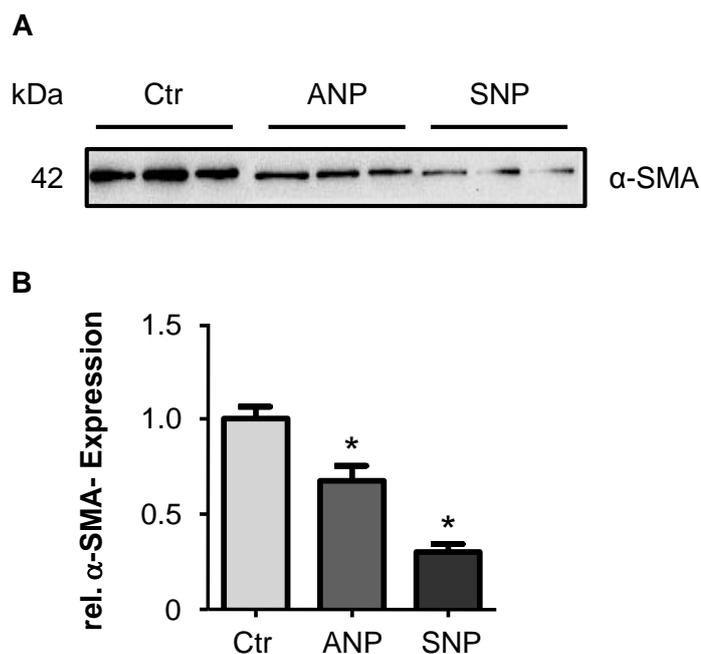


Abb. 7: Immunoblot zur Überprüfung der Zellkulturbedingungen nach Serumentzug. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μ M ANP oder 40 μ M SNP für 24 h stimuliert. Unstimulierte nRFB dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden in 150 μ l Lyse-Puffer pro Well lysiert. Im Anschluss wurde die α -SMA-Expression (anti- α -SMA) in den Lysaten im Immunoblot analysiert. (A) Immunoblot. Die Daten wurden auf die geladene Proteinmenge (Ponceau S-Färbung) normalisiert. (B) Graphische Darstellung der in (A) erhobenen Daten. n=3. Statistische Signifikanz mit *Student's t-Test*. *p<0,05.

Sowohl in den Kontroll-, als auch in den stimulierten Zellen konnte die Expression von α -SMA nachgewiesen werden, welches bestätigt, dass auch die serumfreie Kultivierung von Fibroblasten zur Transdifferenzierung hin zu Myofibroblasten führt. Die Transdifferenzierung ließ sich durch das antifibrotische Potential von cGMP erwartungsgemäß aufhalten bzw. umkehren. Die ANP-behandelten nRFB zeigten eine um ca. 32% reduzierte α -SMA-Expression, SNP-stimulierte nRFB wiesen sogar eine Expressionsreduktion von ca. 70% auf. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass ähnliche Effekte durch das ebenfalls antifibrotisch wirkende cAMP in Fibroblasten zu beobachten sind und führte zu der Frage, welche Rolle dabei I-1 spielen könnte.

3.4 Effekte chronischer β -adrenerger-Stimulation auf neonatale Rattenfibroblasten

Aus der Literatur ist bekannt, dass chronische β -adrenerge Stimulation zu kardialer Hypertrophie (Dorn und Molkentin 2004, El-Armouche und Eschenhagen 2009) und zur Ausbildung einer kardialer Fibrose (Bonnetfont-Rousselot et al. 2002, Brouri et al. 2004) führen kann. Auf der anderen Seite ist ebenso bekannt, dass cAMP, ein zentraler *second-messenger* innerhalb der β -adrenergen Signalkaskade, antifibrotische Eigenschaften besitzt (Davaille et al. 2000, Heusinger-Ribeiro et al. 2001, Lu et al. 2013, Schiller et al. 2010, Swaney et al. 2005, Yokoyama et al. 2008) und inhibitorisch auf die Myofibroblasten-Transdifferenzierung wirkt (Miller et al. 2011, Swaney et al. 2005).

Welche Auswirkungen chronische β -adrenerge Stimulation auf kardiale Fibroblasten im Einzelnen hat, ist nicht sicher belegt. Gerade dieses ist von besonderem Interesse, da Fibroblasten bzw. Myofibroblasten als EZM-sezernierende Zellen den zellulären Ausgangspunkt einer kardialen Fibrose bilden (siehe Kap. 1.7). Zur Analyse, inwieweit chronische β -adrenerge Stimulation Fibroblastenmonokulturen pro- oder antifibrotisch beeinflusst, wurden kultivierte kardiale neonatale Rattenfibroblasten für 24 h mit 1 μ M des nicht-selektiven β -Sympathomimetikums Isoprenalin stimuliert. Anschließend wurde die Expression des Myofibroblasten-Markerproteins α -SMA im Immunoblot untersucht (siehe Abb. 8). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Um Aussagen bezüglich des Einflusses β -adrenerger Stimulation auf α -SMA Expressionspiegel in kultivierten und stimulierten nRFB treffen zu können, musste die Anwendung des anti- α -SMA-Antikörpers für diesen Versuch optimiert werden. Zur Identifizierung des linearen Bereichs der Antikörperfärbung, war es zunächst notwendig, eine geeignete Proteinladungsmenge und eine optimale Antikörperkonzentration zu finden. Hierfür wurden zwei SDS-Gele mit unterschiedlichen Proteinnengen (0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g und 6 μ g) beladen. Auch die Sekundärantikörperkonzentration wurde variiert. Eine der Membranen wurde mit dem Sekundärantikörper *anti-mouse* in einer Konzentration von (i) 1:10.000 inkubiert, während für

die zweite Membran eine Konzentration von (ii) 1:20.000 gewählt wurde. Die Primärantikörperkonzentration (1:2.000) blieb jeweils konstant.

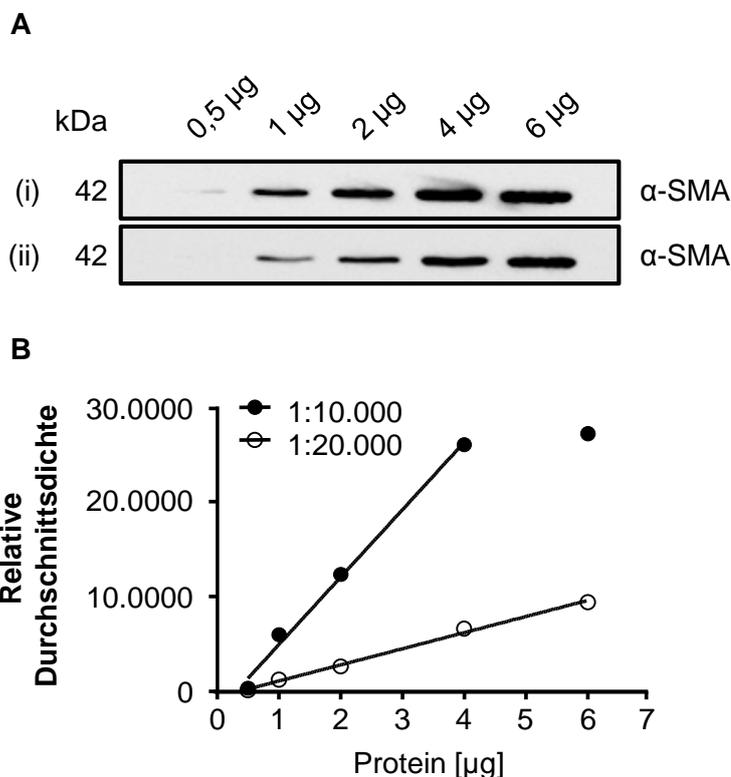


Abb. 8: Vorversuch zur Optimierung des anti- α -SMA-Antikörpers I. nRFB (P1) wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend wurden die Zellen in 150 μ l Lyse-Puffer pro Well lysiert. Es wurden jeweils zwei Gele (10%) mit unterschiedlichen Lysatmengen (0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g und 6 μ g) beladen. Die α -SMA-Expression (anti- α -SMA) in den Lysaten wurde im Immunoblot analysiert. (A) Immunoblot zur Etablierung mit einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:10.000 (oben) und 1:20.000 (unten). (B) Graphische Gegenüberstellung der relativen Durchschnittsdichte der α -SMA-Signalbanden beider Membranen im linearen Bereich.

Die mit unterschiedlichen Sekundärantikörperkonzentrationen inkubierten Verdünnungsreihen zeigen beide im Bereich von 1 – 4 μ g geladener Proteinmenge zunächst ein lineares Verhältnis zwischen Proteinmenge und relativer Durchschnittsdichte des Chemilumineszenzsignales (siehe Abb. 8B), in der mit Verdopplung der Proteinmenge auch eine Verdopplung des Chemolumineszenzsignals zu beobachten ist. Bei der verwendeten Zweitantikörperkonzentration von 1:10.000 lässt sich mit steigender Proteinmenge (6 μ g) jedoch keine weitere relevante Zunahme der Signalintensität abgrenzen; die Signalstärke scheint bereits im Sättigungsbereich zu liegen. Demgegenüber setzt sich der lineare Bezug zwischen Proteinmenge und Signalintensität bei einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:20.000 und höherer Lademenge (6 μ g) fort. Für Folgeversuche wurde daher ei-

ne Zweitantikörperverdünnung von 1:20.000 verwendet und eine Lademenge von 2 µg Proteinlysate gewählt. Diese Bedingungen wurden im folgenden Immunoblot verwendet, um erneut zu untersuchen, inwieweit β -adrenerge Stimulation die α -SMA-Expression bzw. die Myofibroblasten-Transdifferenzierung beeinflusst. Es wurde mit 1 µM Isoprenalin für 24 h stimulierte und unstimulierte nRFB als Kontrolle verwendet.

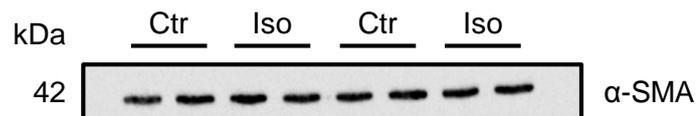


Abb. 9: Vorversuch zur Optimierung des anti- α -SMA Antikörpers II. nRFB (P1) wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten inkubiert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µM Isoprenalin chronisch für 24 h stimuliert. Nach 12 h Inkubationszeit wurde erneut 1 µg Isoprenalin hinzugegeben. Unstimulierte nRFB (P1) dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden in 150 µl Lyse-Puffer lysiert. Die α -SMA-Expression (anti- α -SMA) in den Lysaten wurde im Immunoblot analysiert. Es wurde eine Lademenge von 2 µg Lysat und eine Zweitantikörperkonzentration von 1:20.000 verwendet.

Trotz der im Vorversuch ermittelten vermeintlich optimalen Kombination aus Lademenge und Antikörperkonzentrationen schien die Signalstärke des Chemilumineszenzsignals erneut im Sättigungsbereich des Nachweissystems zu liegen (siehe Abb. 9). Präparationsbedingte Schwankungen in der α -SMA-Expression zwischen stimulierten Zellen und Kontrollzellen konnten nicht sicher quantifiziert werden, sodass weitere Etablierungsversuche notwendig waren. Hierfür wurden unterschiedliche Bedingungen gewählt (siehe Tab. 15).

Versuch	Lademenge [µg]	Primärantikörper-Konzentration (anti- α -SMA)	Sekundärantikörper-Konzentration (anti-mouse)
i	1	1:2.000	1:20.000
ii	2	1:2.000	1:30.000
iii	4	1:5.000	1:20.000

Tab. 15: Vorversuch zur Optimierung des anti- α -SMA-Antikörpers. Versuchsanordnung zur Findung der geeigneten Lademenge und Antikörperkonzentration.

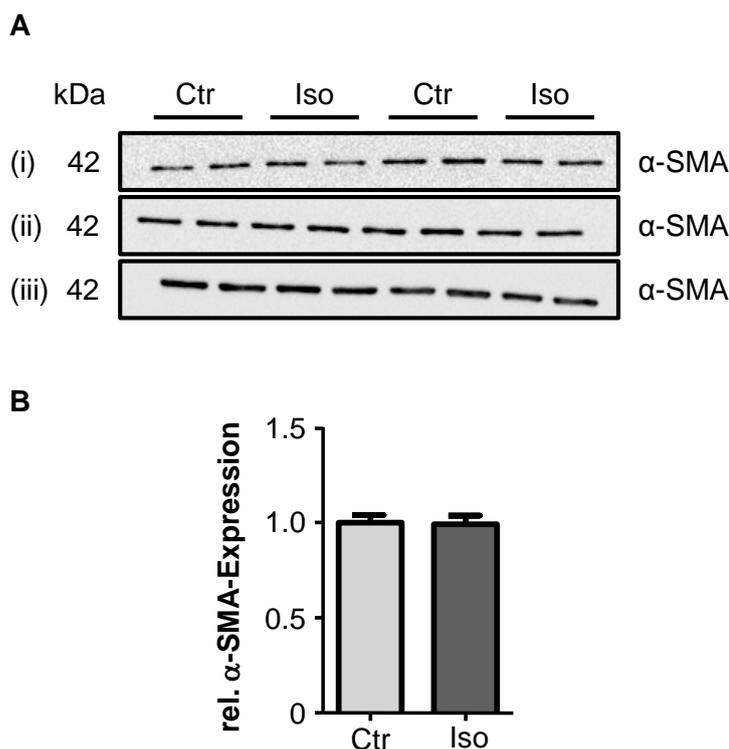


Abb. 10: Etablierung des anti- α -SMA-Antikörpers III. Vergleich unterschiedlicher Lademengen, Primärantikörper-Konzentrationen und Sekundärantikörper-Konzentrationen. nRFB (P1) wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μ M Isoprenalin chronisch für 24 h stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden in 150 μ l Lyse-Puffer lysiert. Die α -SMA-Expression (anti- α -SMA) in den Lysaten wurde im Immunoblot analysiert. (A) i. Immunoblot mit einer Lademenge von 1 μ g Proteinlysate, einer Primärantikörperkonzentration von 1:2.000 und einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:20.000. ii. Immunoblot mit einer Lademenge von 2 μ g, einer Primärantikörperkonzentration von 1:2.000 und einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:30.000. iii. Immunoblot mit einer Lademenge von 4 μ g, einer Primärantikörperkonzentration von 1:5.000 und einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:20.000. (B) Quantifizierung der nicht normalisierten, in (A) erhobenen Daten.

Die in Versuch i gewählten Bedingungen brachten eine schwache Signalbande bei mäßigem Hintergrundrauschen hervor, während die Signalintensität der Banden im Versuch iii erneut im Sättigungsbereich des Nachweissystems lag (siehe Abb. 10A). In Versuch ii hingegen zeigte sich ein deutliches Signal unterhalb des Sättigungsbereiches ohne Anzeichen von Hintergrundrauschen oder Überblendung. Die im Versuch ii gewählten Bedingungen (2 μ g Proteinladungsmenge, Primärantikörper 1:2.000, Sekundärantikörper 1:30.000) wurden fortan für weitere Proteinanalytik mit dem anti- α -SMA-Antikörper verwendet.

Die quantitative Auswertung des Versuches ii (siehe Abb. 10B) zeigte keinen Unterschied in der α -SMA-Expression zwischen Isoprenalin-stimulierten Zellen und der Kontrollgruppe. In diesem Experiment ließ sich kein Einfluss β -adrenerger Stimulation auf die α -SMA-Expression bzw. Myofibroblasten-Transdifferenzierung nachweisen.

3.5 Funktionelle Charakterisierung des Inhibitor-1 in Fibroblasten

Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Aktivierung der β -adrenergen Signalkaskade in Fibroblasten extrazellulär auf Rezeptorebene über den Agonisten Isoprenalin. In den so durchgeführten Experimenten konnten keine eindeutigen pro- oder antifibrotischen Effekte, gemessen anhand der α -SMA-Expression, auf Fibroblasten bzw. kein Effekt auf die Transdifferenzierung hin zu Myofibroblasten (siehe Kap. 3.4), gezeigt werden. Dieses brachte die Frage auf, ob sich durch die intrazelluläre Verstärkung der Signalkaskade mittels Überexpression von I-1 ein Effekt der β -AR-Aktivierung in Fibroblasten detektieren ließe. Damit ausschließliche Effekte von I-1 nicht von Isoprenalin-induzierten Effekten maskiert würden, wurde ebenso die konstitutiv aktive Mutante I-1c, untersucht. Bedingt durch einen Basenaustausch (Threonin 35 gegen Aspartat, T35D) und eine gleichzeitige Verkürzung der Aminosäuresequenz auf 65 AS befindet sich diese Variante unabhängig vom Phosphorylierungszustand in ihrer aktiven Form (Endo et al. 1996, Wittköpper 2009), sodass die Aktivierung von I-1 via Phosphorylierung nicht notwendig war.

3.5.1 Adenovirale Überexpression von Inhibitor-1 und seiner konstitutiv aktiven Mutante I-1c

Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass endogener I-1 trotz seiner funktionellen Relevanz insgesamt nur schwach im Herzgewebe exprimiert wird (Wittkopper et al. 2011). Um die potentiellen Effekte von I-1 untersuchen zu können, wurden I-1 und die konstitutiv aktive Variante I-1c in nRFB überexprimiert. Zur Transduktion wurden die rekombinanten Adenoviren Ad-I-1 (Ad-I-1/eGFP) und Ad-I-1c (Ad-I-1c/eGFP) verwendet. Ad-I-1 und Ad-I-1c kodieren neben ihrer I-1 Isoform, unter Regulation durch einen separaten Promotor

(Cytomegalievirus-Promotor, CMV-Promotor), auch für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) (He et al. 1998). Zur Kontrolle wurden daher zusätzlich Fibroblasten mit einem ausschließlich eGFP-kodierenden Adenovirus (Ad-eGFP) transduziert.

3.5.1.1 Charakterisierung einer für neonatale Rattenfibroblasten geeigneten *Multiplicity of Infection*

Für Folgeversuche musste eine ausreichend starke Überexpression von I-1, I-1c und eGFP in Fibroblasten erreicht werden. Hierfür war es zunächst notwendig, eine geeignete Viruskonzentration (*Multiplicity of Infection*, MOI) zu bestimmen. Diese sollte bei nur moderaten zytotoxischen Effekten eine hohe Transduktionseffizienz besitzen. Zur Charakterisierung einer für Fibroblastenkulturen geeigneten MOI erfolgte die adenovirale Transduktion (Ad-I-1c, Ad-eGFP) der nRFB mit unterschiedlichen MOI (30, 100, 300). 24 h nach Transduktion wurde das Transduktionsergebnis unter dem Durchlichtmikroskop evaluiert, indem das ungefähre Ausmaß der eGFP positiven (= transduzierten) und adhärenenten (= vitalen) Zellen mit den abgekugelten (= avitalen) Zellen in Relation gesetzt wurde. Ziel war, diejenige MOI zu finden, die eine hohe Anzahl eGFP-positiver Zellen bei gleichzeitig nur minimaler Anzahl abgekugelter Zellen hervorbringt.

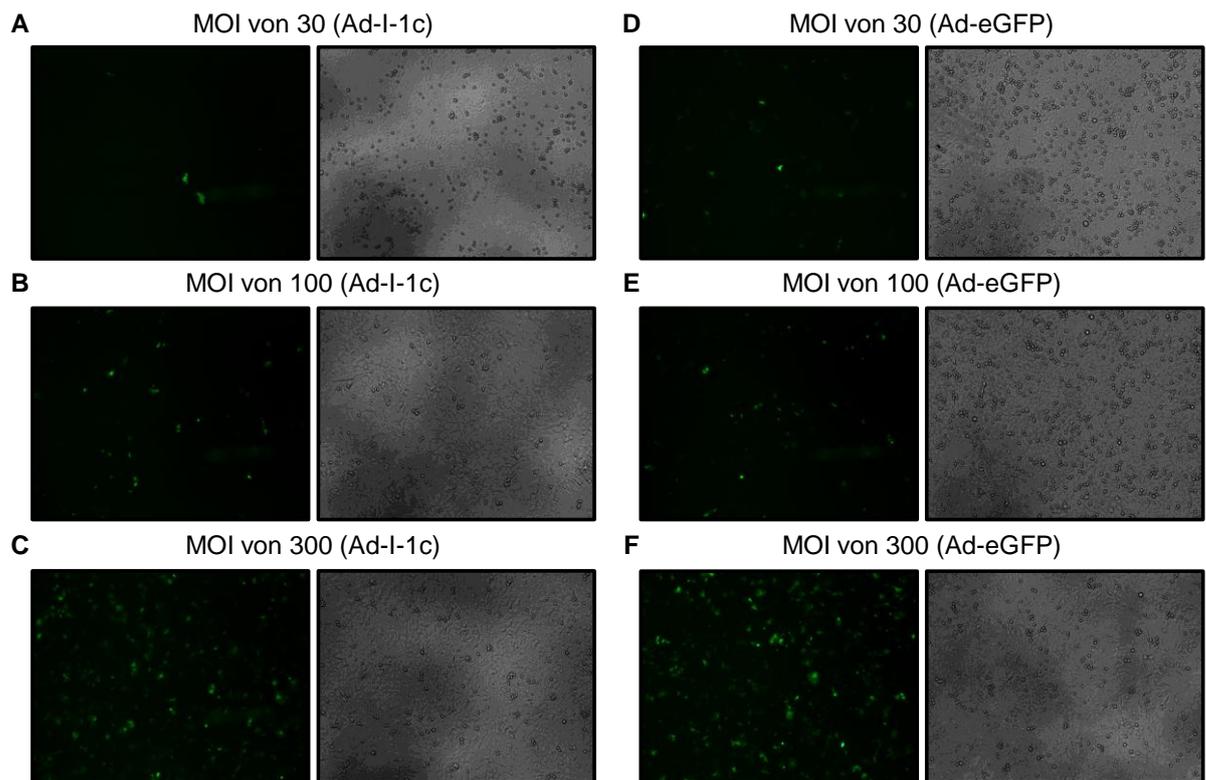


Abb. 11: Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Charakterisierung einer für nRFB geeigneten *Multiplicity of Infection* (MOI). nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP, Ad-I-1 oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium kultiviert. Danach wurde das Transduktionsergebnis fluoreszenz- und durchlichtmikroskopisch kontrolliert. (A) – (C) Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Ad-I-1c-transduzierten nRFB (P1). (A) MOI = 30. (B) MOI = 100. (C) MOI = 300. (D) – (F) Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von Ad-eGFP-transduzierten nRFB (P1). (D) MOI = 30. (E) MOI = 100. (F) MOI = 300.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abb. 11) zeigten eine hohe Anzahl eGFP-positiver Fibroblasten mit deutlicher Signalintensität in ähnlichem Ausmaß bei einer MOI von 300 (Ad-I-1c, Ad-eGFP) bzw. bei einer MOI von 100 (Ad-I-1). Gleichzeitig ließen sich bei diesen MOI eine nur moderate Anzahl avitaler Zellen in der Durchlichtmikroskopie erfassen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für folgende Transduktionen mit Ad-I-1c und Ad-eGFP eine MOI von 300 bzw. eine MOI von 100 für Ad-I-1 gewählt. Da die adenovirale Transduktion rezeptorvermittelt verläuft, kann die Transduktionseffizienz je nach Zellpräparation und Zellpassage variieren. Daher erfolgte die fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Kontrolle der transduzierten Fibroblasten nach jeder Transduktion.

3.5.1.2 Proteinanalytische Verifizierung der Protein-Überexpression von Inhibitor-1 und seiner konstitutiv aktiven Mutante

Die Transkription von I-1, I-1c und eGFP erfolgte über zwei separate CMV-Promotorelemente. Das von den transduzierten Zellen (Ad-I-1/eGFP, Ad-I-1c/eGFP) nach Anregung emittierte Fluoreszenzsignal zeigt lediglich die erfolgreiche Überexpression von eGFP an. Rückschlüsse hinsichtlich der Überexpression von I-1 oder bzw. I-1c lassen sich aufgrund des Fluoreszenzsignals hingegen nicht ziehen. Daher musste die Überexpression der Zielproteine zunächst verifiziert werden. Hierfür wurde im Immunoblot analysiert, ob in den Ad-I-1- und Ad-I-1c-transduzierten Fibroblasten eine tatsächlich verstärkte Expression des jeweiligen Proteins zu detektieren war. Als Negativkontrollen dienten nicht-transduzierte (Ctr) und Ad-eGFP-transduzierte Zellen. Rekombinantes I-1c-Protein wurde als Positivkontrolle (Ctr+) im Immunoblot zum I-1c-Nachweis mitgeführt.

Obwohl I-1 ein berechnetes Molekulargewicht von 19 kDa besitzt (Elbrecht et al. 1990), ließen sich die spezifischen I-1-Banden bei einem Molekulargewicht ca. 26 kDa erfassen (siehe Abb. 12). Diese aus der Literatur bekannte Größendiskrepanz ist wahrscheinlich durch eine geringe Bindungsaffinität des I-1 gegenüber den verwendeten Detergenzien zu erklären (Nimmo und Cohen 1978). Die Immunoblots zeigten erwartungsgemäß eine deutliche I-1-Signalbande in den Ad-I-1-transduzierten nRFB. Ebenso zeigte sich eine ausgeprägte I-1c-Signalbande in den Ad-I-1c-transduzierten Fibroblasten. Im Gegensatz dazu konnte der endogene I-1 in den Kontrollen nicht nachgewiesen werden.

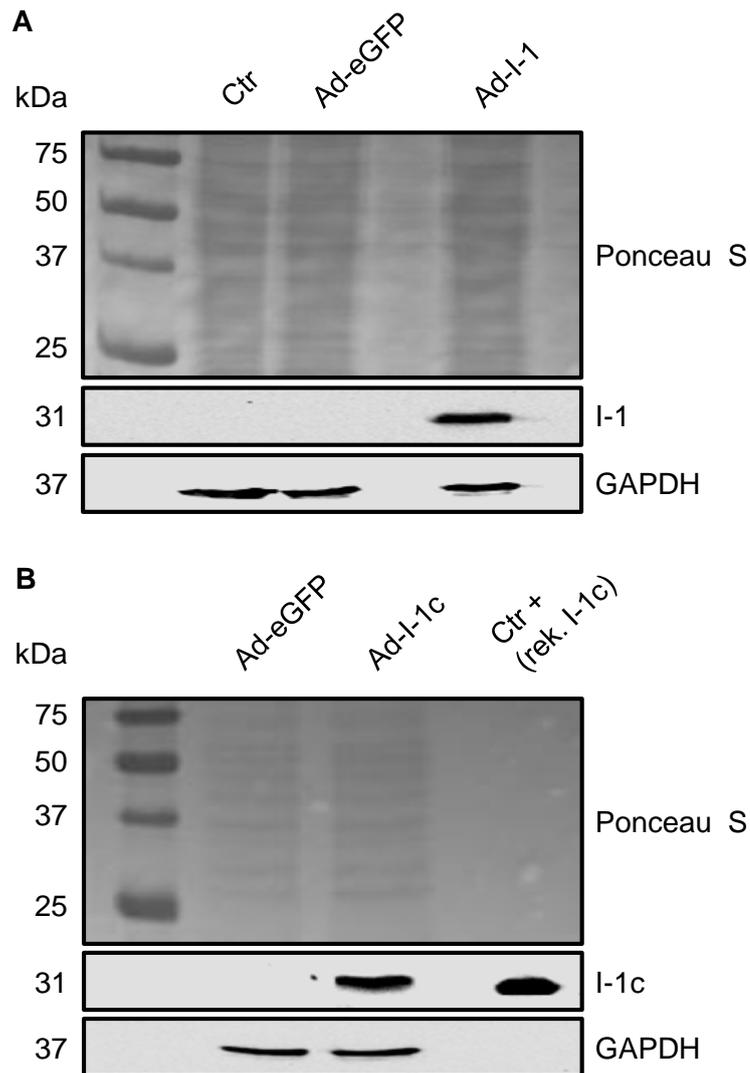


Abb. 12: Immunoblot zur Verifizierung der Protein-Überexpression. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP-, Ad-I-1 oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium kultiviert und im Anschluss mit 150 μ l Lyse-Puffer lysiert. Unbehandelte nRFB dienen als Kontrolle. (A) Die I-1-Expression (anti-I-1) und die GAPDH-Expression (anti-GAPDH) in den Lysaten wurden im Immunoblot analysiert. (B) Analyse der I-1c-Expression (anti-c-myc) und der GAPDH-Expression in den Lysaten im Immunoblot. Aufgereinigtes I-1c-Protein diene als Positivkontrolle.

3.5.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Inhibitor-1 in Fibroblasten durch chronische β -adrenerge Stimulation

Mehrere Forschungsarbeiten haben sich bereits mit den Auswirkungen β -adrenerger Stimulation auf I-1 in kardialen Zellen beschäftigt. In den meisten Arbeiten wurde der Schwerpunkt jedoch auf die Zellpopulation der Kardiomyozyten gelegt. Es konnte in KM gezeigt werden, dass I-1 durch akute und chronische Isoprenalin-Stimulation phosphoryliert wird (Ahmad et al. 1989, Gupta et al. 1996, Neumann et al. 1991). Ist I-1 PKA-abhängig an Threonin-35 phosphoryliert, befindet er sich in seiner inhibitorisch-aktiven Form (Endo et al. 1996). Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob überexprimierter I-1 in Fibroblasten ebenfalls durch β -adrenerge Stimulation phosphoryliert wird. Dafür wurden nRFB mit Ad-I-1 (MOI = 300) transduziert und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellstimulation mit Isoprenalin über einen Zeitraum von 24 h. Initial wurden unterschiedliche Konzentrationen in logarithmischer Konzentrationsabstufung zur Zellstimulation gewählt (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM Isoprenalin). Unstimulierte Zellen (0 nM Isoprenalin) dienten als Negativkontrolle. Im Immunoblot wurde anschließend die I-1-Phosphorylierung analysiert. Zur Detektion des phosphorylierten I-1 wurde der phosphospezifische Antikörper (spezifisch für die Thr35-Bindungsstelle) anti-DARPP-32 verwendet. Die Normalisierung der Daten erfolgte auf die Gesamtmenge an I-1.

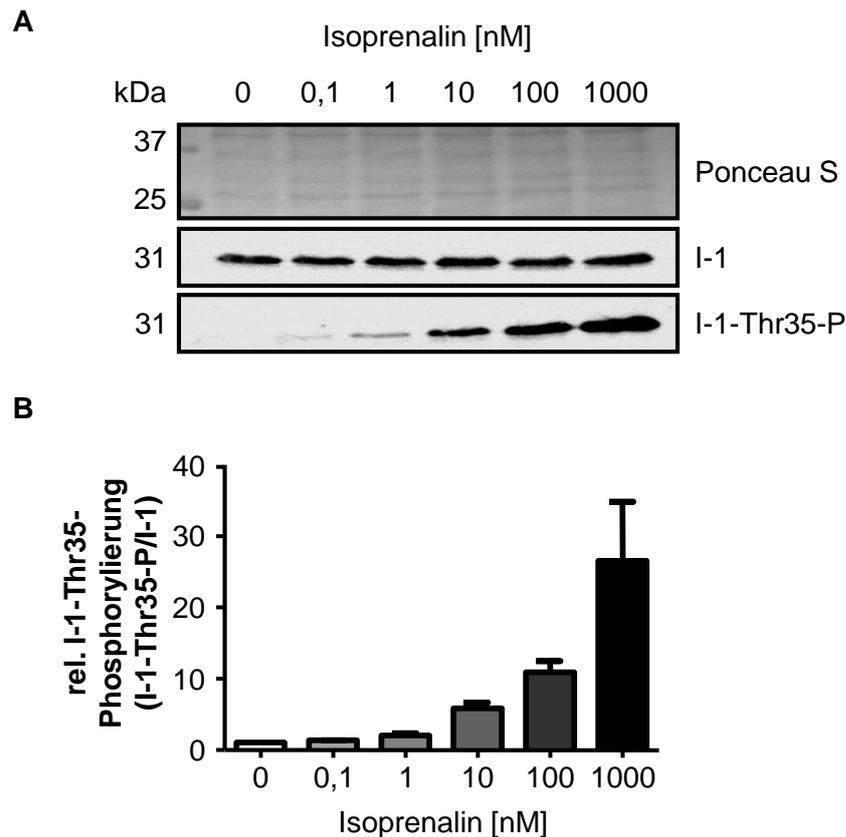


Abb. 13: Immunoblot zur Analyse der I-1-Phosphorylierung in Fibroblasten durch chronische β -adrenerge Stimulation. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten inkubiert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-I-1 im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 h im Fibroblasten-Medium kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in der angegebenen Konzentration mit Isoprenalin chronisch für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden mit 150 μ l Lyse-Puffer lysiert. Die I-1-Phosphorylierung (anti-DARPP-32) und die I-1-Expression (anti-I-1) in den Lysaten wurden im Immunoblot analysiert. Die Daten wurden auf I-1 normalisiert. (A) Immunoblot nach Isoprenalin-Stimulation. (B) Quantifizierung der I-1-Phosphorylierung. n=2.

Die Auswertung des Immunoblots zeigte eine Isoprenalin-vermittelte und konzentrationsabhängige Phosphorylierung des I-1 (siehe Abb. 13). Der ausgeprägteste Phosphorylierungsgrad ließ sich bei einer Isoprenalinkonzentration von 1.000 nM nachweisen. Somit wurde erstmals gezeigt, dass β -AR-Stimulation I-1 in Fibroblasten phosphoryliert und in seine inhibitorisch-aktive Form überführt. Unabhängig vom Phosphorylierungsgrad wurde die I-1-Gesamtexpression jedoch nicht verändert. Zwischen den mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen stimulierten Fibroblasten ließ sich kein signifikanter Unterschied in der I-1-Gesamtexpression nachweisen.

3.5.3 Charakterisierung des Inhibitor-1-aktivierenden β -Adrenozeptor-Subtyps in Fibroblasten

Nachdem gezeigt worden war, dass I-1 in Fibroblasten durch β -adrenerge Stimulation phosphoryliert wird, kam die Frage auf, über welchen β -Adrenozeptor-Subtyp seine Phosphorylierung mediiert wird. Gustafsson und Brunton haben 2000 auf RNA-Ebene nachgewiesen, dass β_2 -Adrenozeptoren (AR) den prädominanten Rezeptorsubtypen im Herzen bilden. Turner *et al.* konnten 2003 zeigen, dass die Isoprenalin-induzierte Aktivierung der Adenylylcyclase sowie der p44/42 mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) über β_2 -AR verläuft. Um zu überprüfen, ob auch die Phosphorylierung von I-1 über β_2 -AR vermittelt wird, wurden zunächst subtypspezifisch entweder β_1 - oder β_2 -AR in I-1-exprimierenden Fibroblasten blockiert. Zur β_1 -AR-Blockade wurden die Zellen mit dem selektiven β_1 -Antagonist CGP 20712 Dihydrochlorid (CGP) für 10 min in unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM) behandelt. Die β_2 -AR-Blockade erfolgte über einen Zeitraum von 10 min unter Verwendung von unterschiedlich konzentriertem (3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM) ICI 118,551 Hydrochlorid (ICI), einem selektiven β_2 -Antagonisten. Im Anschluss daran wurden die Fibroblasten mit 100 nM des unselektiven β -Sympathomimetikums Isoprenalin für 10 min stimuliert. Zuletzt wurde auf Proteinebene analysiert, ob β_1 - und/oder β_2 -AR-Blockade zur Reduktion der I-1-Phosphorylierung führt.

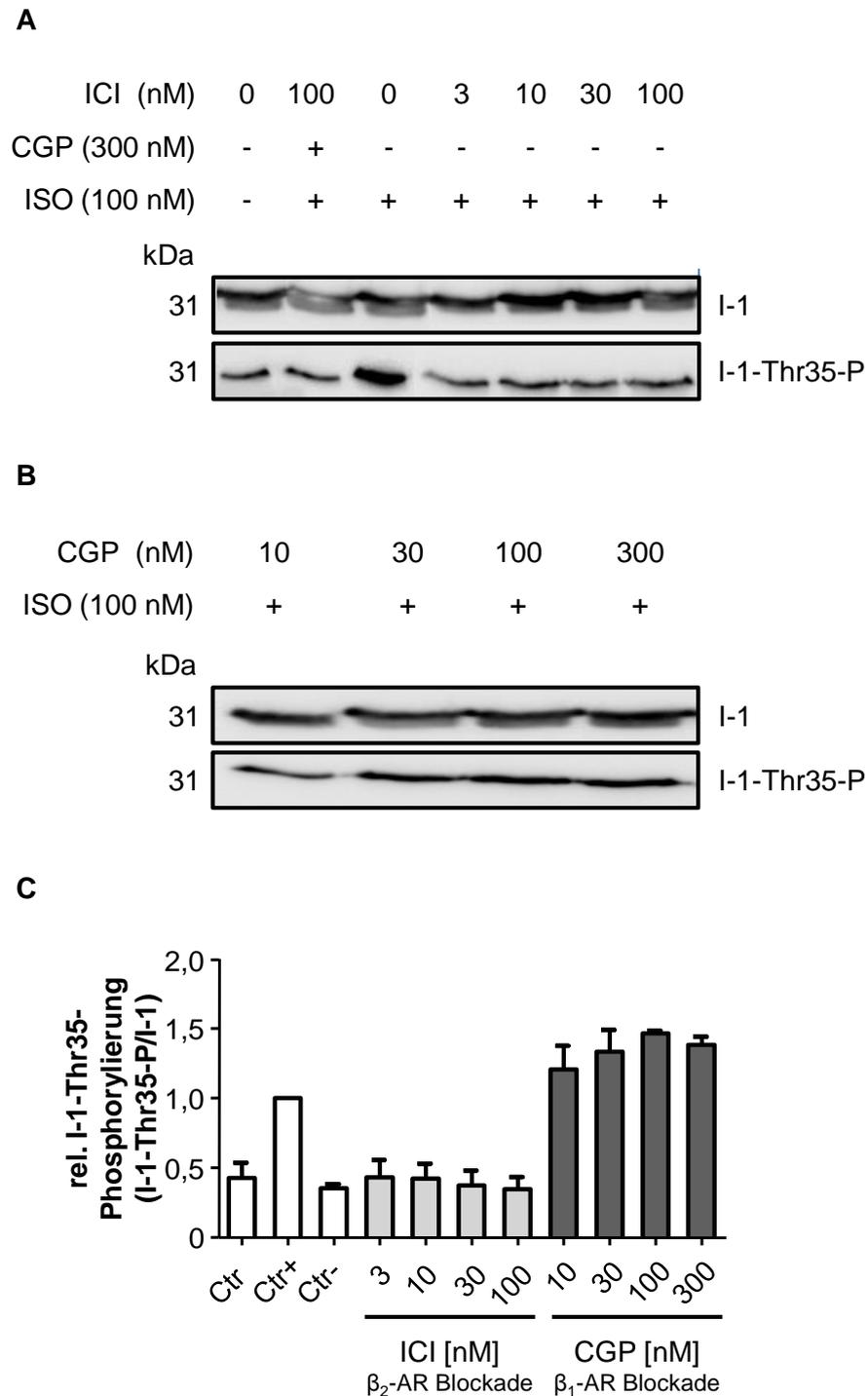


Abb. 14: Charakterisierung des I-1-aktivierenden β -Adrenozeptor-Subtyps in Fibroblasten. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP oder Ad-I-1 im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für 24 h im Fibroblasten-Medium kultiviert und 3 h vor Behandlung vom Serum befreit. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit CGP 20712 Dihydrochlorid (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM) oder ICI 118,551 Hydrochlorid (3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM) für jeweils 10 min. Danach wurden die Zellen mit 100 nM Isoprenalin für 10 min stimuliert und in 150 μ l Lyse-Puffer lysiert. Die Phosphorylierung des überexprimierten I-1 an Thr35 (anti-DARPP-32) sowie die Expression von I-1 (anti-I-1) in den Lysaten wurde im Immunoblot analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, Ad-I-1-transduzierte nRFB (Ctr), Ad-I-1-transduzierte und

mit 100 nM Isoprenalin stimulierte nRFB (Ctr+) und Ad-I-1-transduzierte, mit 300 nM CGP und 100 nM ICI behandelte und anschließend mit 100 nM Isoprenalin stimulierte nRFB (Ctr-). Die Daten wurden auf I-1 normalisiert (anti-I-1). n=2. (A) Immunoblot zur Identifikation des I-1-aktivierenden β -AR-Subtyps in nRFB nach selektiver β_2 -AR-Blockade (ICI) und Isoprenalin-Stimulation. (B) Immunoblot zur Identifikation des I-1-aktivierenden β -AR-Subtyps in nRFB nach selektiver β_1 -AR-Blockade (CGP). (C) Quantifizierung der in (A) und (B) erhobenen Daten.

Die selektive Blockade der β_2 -AR bewirkte eine völlige Inhibition des Isoprenalin-induzierten Anstiegs der I-1-Phosphorylierung (siehe Abb. 14). Steigende Konzentrationen von ICI hatten keinen weiteren Einfluss auf das Ausmaß der Phosphorylierungsreduktion. Die maximale Wirksamkeit der β_2 -AR-Blockade konnte bereits ab einer Konzentration von 3 nM ICI erzielt werden. Verglichen mit der Positivkontrolle konnte in β_1 -AR-blockierten Fibroblasten keine verminderte Phosphorylierung von I-1 beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus der Literatur und zeigten erstmalig, dass die Phosphorylierung/Aktivierung von I-1 in Fibroblasten über den β_2 -AR-Subtyp mediiert wird.

3.5.4 Auswirkungen des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf kardiale Fibrose

Im zuvor durchgeführten Versuch (siehe Kap. 3.4) konnte anhand der α -SMA-Expression weder eine pro- noch antifibrotische Beeinflussung kardialer Fibroblasten durch β -AR-Stimulation nachgewiesen werden. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die β -adrenerge Stimulation jedoch ausschließlich über die externe Applikation von Isoprenalin. Dieses führte zu der Überlegung, welchen Einfluss die intrazelluläre Verstärkung der β -adrenergen Signalkaskade auf kardiale Fibroblasten ausübt. Dazu wurde zunächst eine verminderte Phosphatase-1-Aktivität unter basalen Bedingungen untersucht, indem die von β -adrenerger Aktivierung unabhängige, konstitutiv aktive Mutante I-1c überexprimiert wurde, sodass auf externe I-1-Aktivierung über Isoprenalin verzichtet werden konnte. Hierfür wurden zunächst Fibroblasten anstelle von Ad-I-1, mit Ad-I-1c oder Ad-eGFP (Kontrolle) transduziert. Anschließend erfolgte die Analyse der Expression Fibrose-assoziiierter Proteinen (α -SMA und CTGF) im Immunoblot.

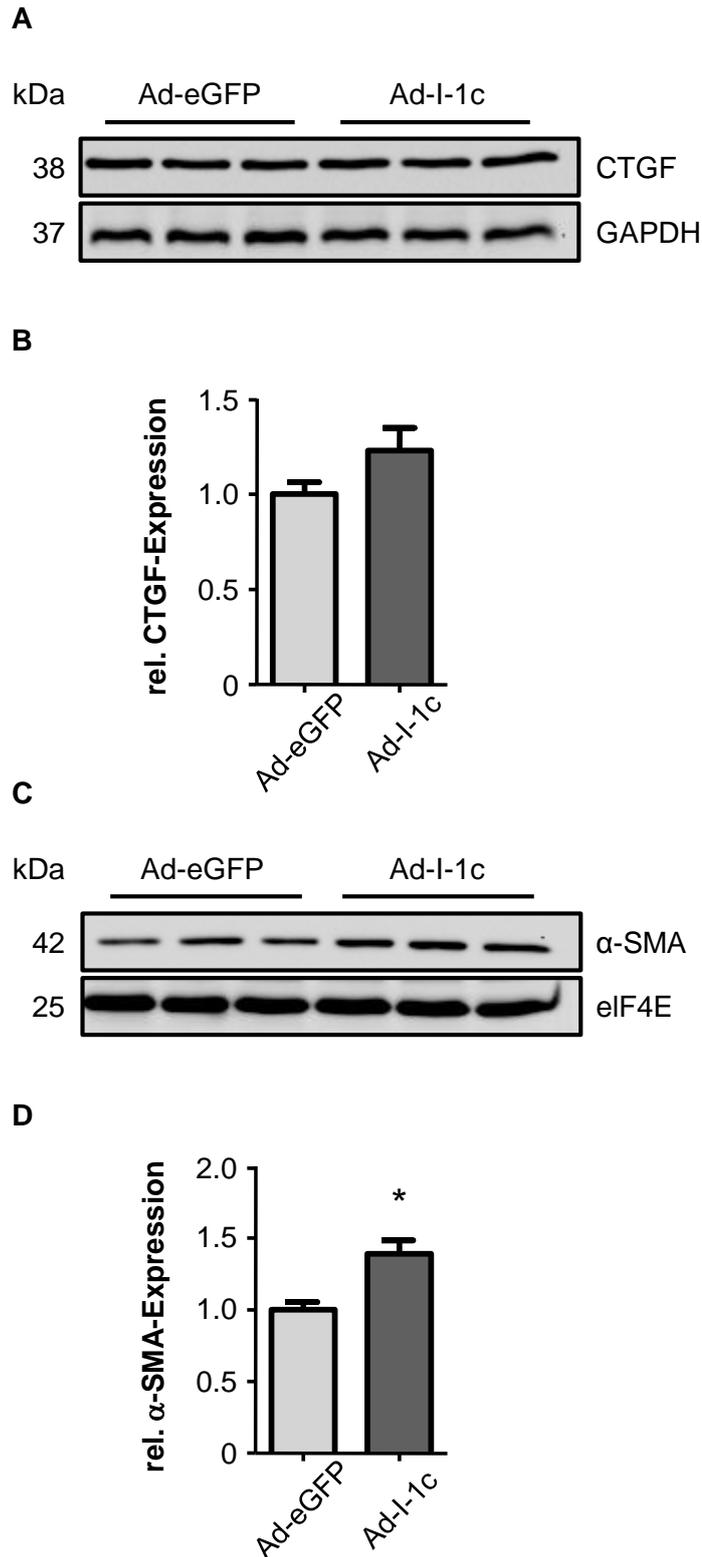


Abb. 15: Immunoblot zur Untersuchung der Auswirkung des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf kardiale Fibrose. Es wurden nRFB bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium inkubiert.

Die Zellen wurden in 150 µl Lyse-Puffer lysiert. (A) Immunoblot zur Analyse des Einflusses von I-1c auf die CTGF-Expression (anti-CTGF). Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert und sind relativ zu eGFP angegeben. (C) Immunoblot zur Analyse des Einflusses von I-1c auf die α -SMA-Expression (anti- α -SMA). Da die Membranen anschließend mit dem PathScan[®] Antikörper-Mix für einen Folgeversuch untersucht wurden, wurde auf eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), ein Protein zur Ladekontrolle und Normalisierung (anti-eIF4E im PathScan[®] Antikörper-Mix enthalten), normalisiert. (B) Graphische Darstellung der in (A) erhobenen Daten. (D) Graphische Darstellung der in (C) erhobenen Daten. Jeweils n=3. *p<0,05.

Die Ergebnisse zeigten erstaunlicherweise eine tendenziell erhöhte CTGF-Expression in I-1c-exprimierenden Fibroblasten, verglichen mit den Kontrollzellen (siehe Abb. 15). Auch die α -SMA-Expressionsanalyse lieferte überraschende Daten. I-1c-transduzierte Fibroblasten wiesen eine signifikante Erhöhung der α -SMA-Expression (~39%) gegenüber den eGFP-transduzierten Zellen auf. I-1c scheint somit Myofibroblasten-Transdifferenzierung eher zu begünstigen. Dieses war insofern bemerkenswert, da die antifibrotischen Effekte des cAMP/PKA-Signalwegs in der Literatur ausführlich beschrieben sind (Davaile et al. 2000, Heusinger-Ribeiro et al. 2001, Miller et al. 2011, Swaney et al. 2005, Vettel et al. 2014, Yokoyama et al. 1999) und daher zu erwarten gewesen wäre, dass die Überexpression von I-1, einem Stabilisator PKA-abhängig phosphorylierter Zielproteine, die Expression von CTGF und α -SMA herunterreguliert.

3.5.5 Durch konstitutiv aktiven Inhibitor-1 induzierte Stressfaser-Bildung

Im vorherigen Experiment konnte ein begünstigender Effekt von I-1 auf die Myofibroblasten-Transdifferenzierung gezeigt werden. Myofibroblasten zeichnen sich durch eine hohe Syntheserate von EZM-Proteinen und durch ihre ausgeprägte Kontraktilität aus (Serini und Gabbiani 1999, Tomasek et al. 2002). Ihre hohe Kontraktilität wird über die Ausbildung von Stressfasern ermöglicht (Hinz et al. 2001 a), welche sowohl im Rahmen der physiologischen Wundheilung als auch in pathologischen Prozessen wie der Fibrose eine wichtige Rolle (Desmouliere et al. 2005, Gabbiani 2003) einnehmen. Stressfasern setzen sich aus ca. 10 – 30 Aktinfilamenten zusammen (Cramer et al. 1997), welche über quervernetzende Proteine wie z. B. α -Aktinin (Lazarides und Burridge 1975) oder α -Aktinin-ähnliche Proteine (Adams 1995, Chen et al. 1999, Wang et al. 1975) gebündelt werden und in periodischen Abständen nicht-muskuläres Myosin (Weber und Groeschel-Stewart 1974) und Tropomyosin (Lazarides 1975) aufweisen. Die Besonderheit

reifer Myofibroblasten liegt in der Expression von α -SMA (siehe Kap. 1.5.1 – 1.5.2), welches wiederum in Stressfasern integriert werden kann (Darby et al. 1990). Im Vergleich zu regulären Stressfasern (mit filamentärem β - oder γ -Aktin) weisen α -SMA-positive Stressfasern eine deutlich höhere Kontraktilität auf (Hinz et al. 2001 b, Pellegrin und Mellor 2007).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich eine vermehrte Ausbildung von α -SMA positiven Stressfasern in I-1c-überexprimierenden nRFB detektieren ließe. Hierfür wurden α -SMA, filamentäres Aktin (mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin) und Zellkerne (DAPI) in I-1c-exprimierenden Fibroblasten und Kontrollzellen visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Erfassung erfolgte am Konfokalmikroskop (LSM 710 NLO, Zeiss).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass alle Zellen ungeachtet der Virusinfektion eine Transformation zum Zelltyp der Myofibroblasten durchlaufen, die mit einer Expression von α -SMA und Bildung von Stressfasern einhergeht (siehe Abb. 16). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunoblots scheinen I-1c-überexprimierende Zellen vermehrt α -SMA zu produzieren (besonders sichtbar an der apikalen Seite) und entsprechend dichter gepackte Stressfasern auszubilden (siehe weiße Pfeile).

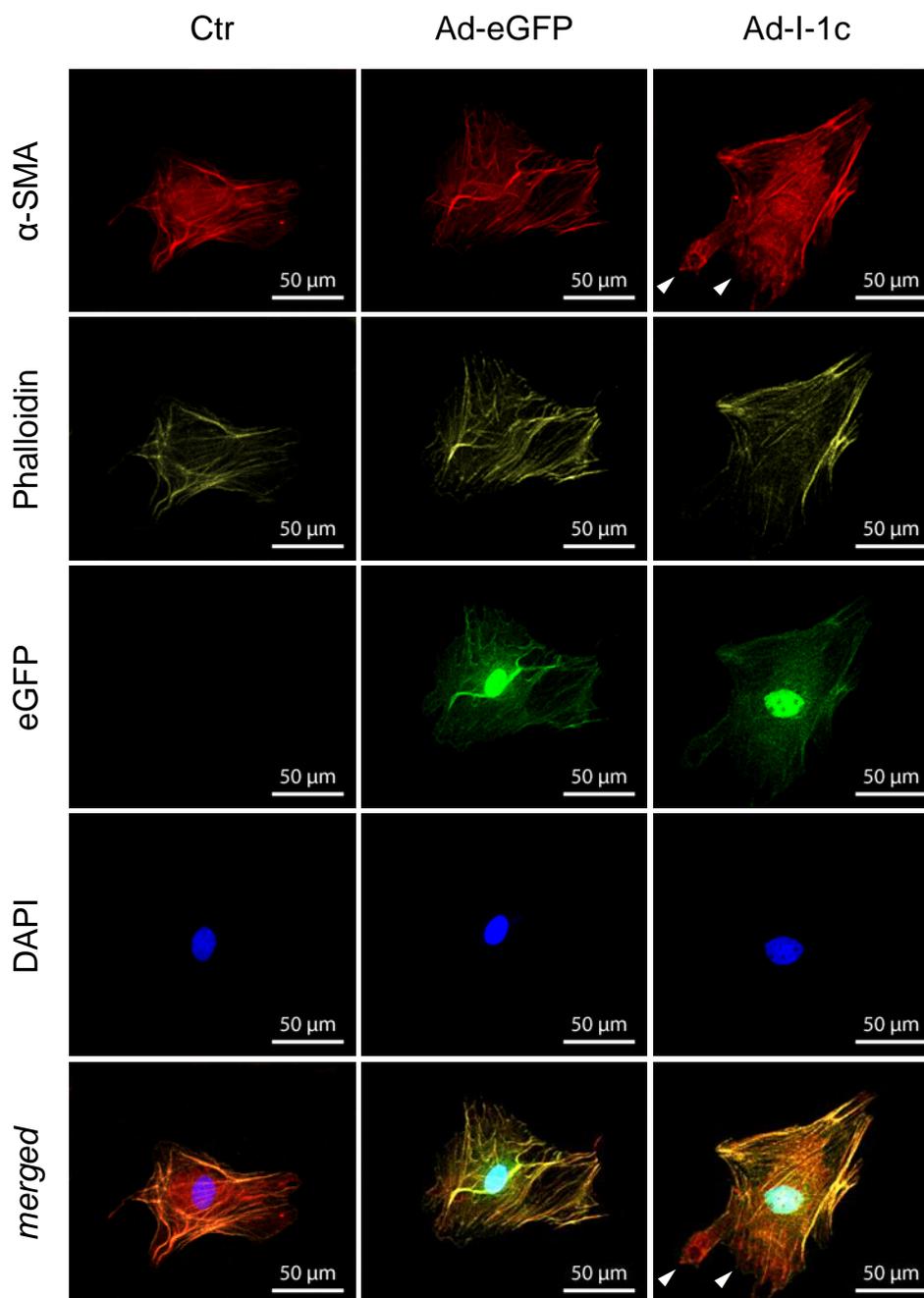


Abb. 16: I-1c-induzierte Stressfaser-Bildung in der konfokalen Mikroskopie. Vermehrte α -SMA-Expression an der apikalen Zellseite in I-1c-transduzierten kardialen Fibroblasten. Es wurden nRFB (ca. 12.500 – 15.000 Zellen/Well) auf (in 12-Well-Platten einliegenden) Deckgläsern ausgesät und im Fibroblasten-Medium inkubiert. Nach deren Adhärenz erfolgte die Transduktion mit Ad-eGFP oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die transduzierten nRFB für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 150 μ l Histofix (4%, Roti[®]) fixiert, unter Verwendung eines Permeabilisierung- und Blockierungspuffer permeabilisiert und blockiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung gefärbt. Zur Detektion von α -SMA wurde der anti- α -SMA-Antikörper sowie Alexa Fluor[®] 546 *anti-rabbit* als Sekundärantikörper verwendet. Die F-Aktin-Filamente des Zytoskeletts wurden mit dem Farbstoff Alexa Fluor[®] 633 Phalloidin visualisiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI. Zusätzlich wurden nicht-transduzierte nRFB analysiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop LSM 710 NLO (Zeiss) erfasst.

3.5.6 Einfluss des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese

Kardiale Fibroblasten spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase der myokardialen EZM (Fan et al. 2012). So werden viele Matrixproteine unter anderem die fibrillären Hauptkomponenten Kollagen Typ I und Typ III sowie EZM-Regulatorproteine von ihnen synthetisiert und exozytotisch freigesetzt (Eghbali 1992). Störungen in der EZM-Homöostase können pathologische Veränderungen des Herzens bedingen, wobei eine gesteigerte Synthese von Kollagenen bei gleichzeitig verminderter Degradation zentrales Element in der kardialen Fibrose ist (Weber et al. 1993).

3.5.6.1 Proteinanalytische Untersuchung zum Einfluss des konstitutiv aktiven Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese

Nachdem gezeigt worden war, dass I-1c-Überexpression die Myofibroblasten-Transdifferenzierung zu begünstigen scheint, kam die Frage auf, ob und inwieweit I-1c die EZM-Homöostase beeinflusst. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Expression von Prokollagen $\alpha 1$ Typ I (Pro-Col1 $\alpha 1$, Präkursorprotein des Kollagen $\alpha 1$ Typ I) in I-1c-exprimierenden Fibroblasten im Immunoblot untersucht und mit eGFP-exprimierenden Zellen verglichen.

Nach Generierung des Chemilumineszenzsignals ließen sich zwei Signalbanden bei unterschiedlichen Molekulargewichten abgrenzen, sodass zunächst die genaue Identifikation der Prokollagen-spezifischen Bande nicht möglich war. Laut Herstellerangaben (Santa Cruz) liegt das Pro-Col1 $\alpha 1$ -Molekulargewicht zwischen 140-210 kDa. Zur Identifikation der spezifischen Bande wurde nach Detektion des Chemilumineszenzsignals die Membran im *Molecular Imager[®] VersaDocTM MP 4000 System* (Bio-Rad) abfotografiert. Da die Membran zwischenzeitlich nicht bewegt wurde, konnten die beiden Signalbanden unter Verwendung der *Quantity One[®] 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) virtuell auf die Molekulargewichtsmarker abbildende Membran projiziert werden (siehe Abb. 17A). Anschließend wurde verglichen, welche der Banden ein Molekulargewicht zwischen 140-210 kDa aufzeigt. So konnte die untere Bande als unspezifisch (ca. 100 – 110 kDa) und die obere Bande als die eigentliche Prokollagen-Bande (ca. 160 – 180 kDa) identifiziert werden.

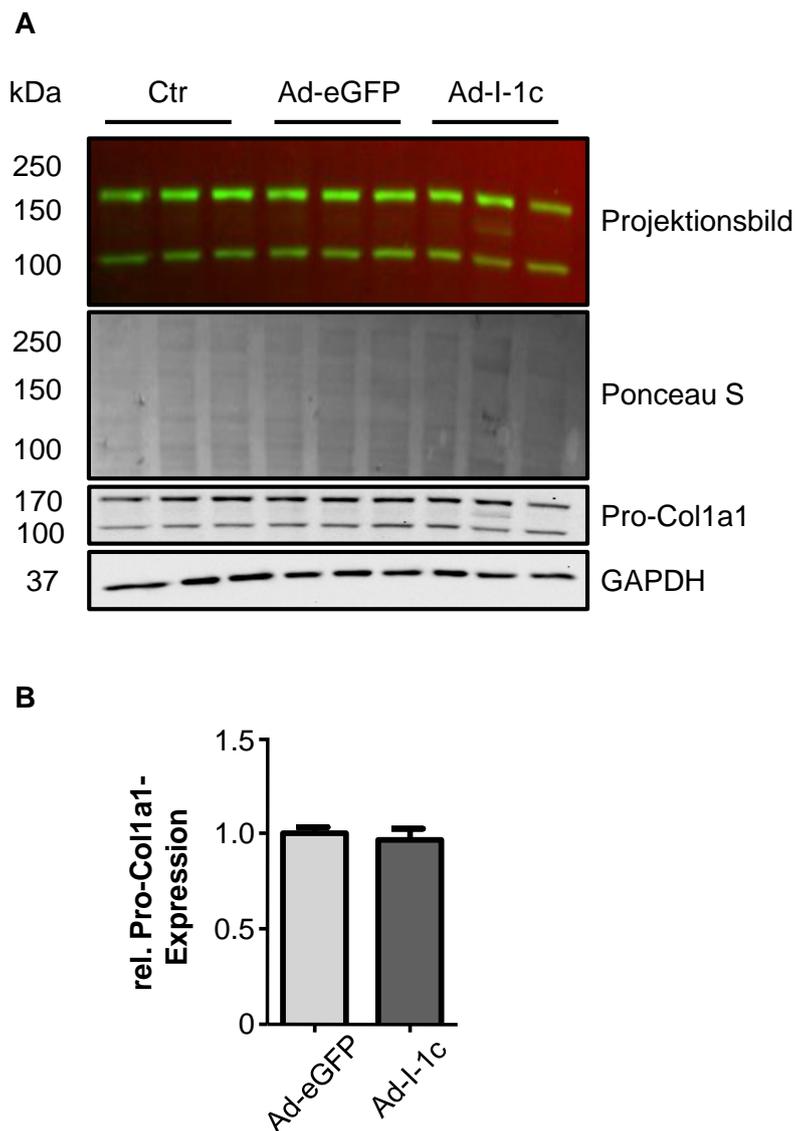


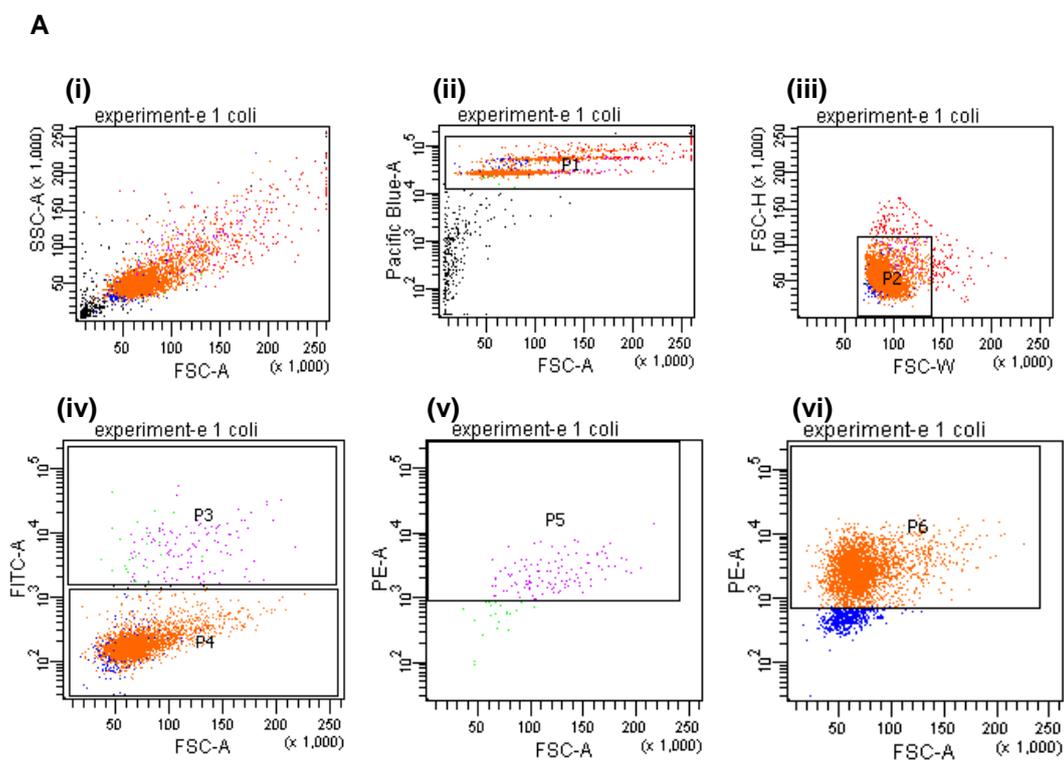
Abb. 17: Proteinanalytische Untersuchung zum Einfluss des I-1c auf die Kollagen-Synthese. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten inkubiert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium inkubiert. Die Zellen wurden in 150 µl Lyse-Puffer lysiert. Unbehandelte nRFB dienten als Kontrolle (Ctr). Die Pro-Col1α1-Expression (anti-Pro-Col1α1) in den Lysten wurde im Immunoblot analysiert. (A) Ermittlung der spezifischen Pro-Col1α1-Bande und Untersuchung der Auswirkung von I-1c auf die Pro-Col1α1-Expression. Das Pro-Col1α1-Chemilumineszenzsignal (grün) wurde unter Verwendung der *Quantity One® 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) virtuell auf die Molekulargewichtsmarker zeigende Membran (rot) projiziert. Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. (B) Graphische Darstellung der erhobenen Daten. n=3.

Die Auswertung der Immunoblots zeigte keinen Unterschied in der Pro-Col1α1-Expression zwischen I-1c-exprimierenden und eGFP-exprimierenden nRFB (siehe Abb. 17B). In diesem Experiment schien I-1c die Kollagen-Synthese nicht zu be-

einflussen. Dieses war zunächst verwunderlich, da aufgrund der vorherigen Ergebnisse (siehe Kap. 3.5.4 und Kap. 3.5.5) eine gesteigerte Kollagen-Synthese in den I-1c-überexprimierenden Zellen zu erwarten gewesen wäre. Daher wurde das Ergebnis im Anschluss mittels durchflusszytometrischer Analytik näher untersucht.

3.5.6.2 Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 auf die Kollagen-Synthese

Anstelle des im Vorversuch auf Proteinebene untersuchten Pro-Col1 α 1 wurde nun das Protein Kollagen Typ I (Col1) selbst in I-1c-überexprimierenden nRFB via Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten eGFP-exprimierende Zellen. Die analysierten Zellen wurden wie in Kap. 2.5 beschrieben vorbehandelt und fluoreszenzmarkiert. Es wurde das Durchflusszytometer BDTM LSR II (BD Biosciences) verwendet. Die Ermittlung und Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der Software FACSDiva (Version 6.1.3, BD Biosciences).



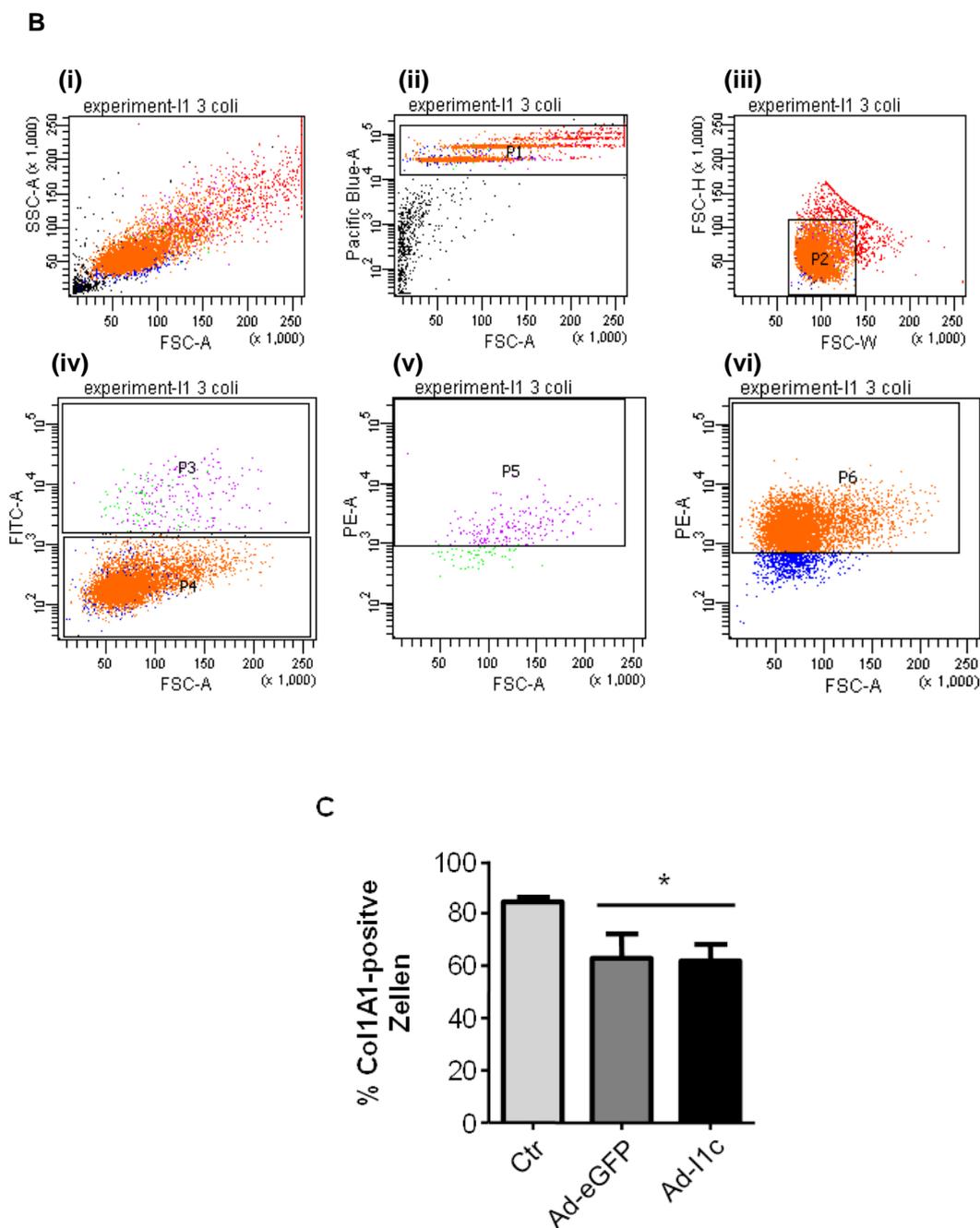


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse zum Einfluss des I-1c auf den Kollagenhaushalt. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Ad-eGFP-transduzierten nRFB. (i) Darstellung aller analysierter Zellen anhand der Relation von Zellgröße und Zellgranularität im Dot Plot. (ii) Anteil der Zellen mit blau-fluoreszierendem Nucleus (intakte Zellen, gate P1) sowie der Zellen ohne gefärbten Zellkern (avitale Zellen) im Dot Plot. (iii) Anteil von Einzelzellen (gate P2) und Dubletten unter den blau-fluoreszierenden intakten Zellen. (iv) Anteil der grün-fluoreszierenden (eGFP-exprimierenden) Zellen (gate P3) sowie der nicht grün-fluoreszierenden (eGFP-negativen) Zellen im Dot Plot. (v) Anteil der rot-fluoreszierenden (Col1-positiven, gate P5) und nicht rot-fluoreszierenden (Col1-negativen) unter den eGFP-positiven Zellen im Dot Plot. (vi) Anteil der rot-fluoreszierenden (Col1-positiven, gate P6) und der nicht rot-fluoreszierenden (Col1-negativen) unter den eGFP-negativen Zellen im Dot Plot. (B) Durchflusszytometrische Analyse der Ad-I-1c-transduzierten nRFB. (i) Darstellung aller analysierter Zellen anhand der Relation von Zellgröße und Zellgranularität im Dot Plot. (ii) Anteil der Zellen mit blau-fluoreszierendem Nucleus (vitale Zellen, gate P1) sowie der Zellen ohne gefärbten Zellkern (avitale Zellen) im Dot Plot. (iii) Anteil von Einzelzellen (gate P2) und Dubletten unter den blau-fluoreszierenden intakten Zellen. (iv) Anteil der grün-fluoreszierenden (I-

1c-exprimierenden) Zellen (gate P3) sowie der nicht grün-fluoreszierenden (I-1c-negativen) Zellen im Dot Plot. (v) Anteil der rot-fluoreszierenden (Col1-positiven, gate P5) und nicht rot-fluoreszierenden (Col1-negativen) unter den I-1c-positiven Zellen. (vi) Anteil der rot-fluoreszierenden (Col1-positiven, gate P6) und der nicht rot-fluoreszierenden (Col1-negativen) unter den I-1c-negativen Zellen. (C) Graphische Darstellung der Col1-positiven Zellen (in %) aus den eGFP- bzw. I-1c-transduzierten nRFB im Vergleich zu eGFP-negativen, nicht transduzierten nRFB (Ctr). n=3. *p<0,05. **Abkürzungen:** FSC (*forward-scattered light*), proportional zur Zelloberfläche bzw. Zellgröße); SSC (*side-scattered light*), proportional zur Zellgranularität bzw. der intra- und extrazellulären Zellstruktur); FITC (Fluoresceinisothiocyanat); PE (Phycoerythrin).

Die hier analysierten Zellen weisen einen nur geringen Anteil an grün-fluoreszierenden (eGFP- bzw. I-1c-positiven, gate P3) Zellen auf (siehe Abb. 18). Vergleicht man die Anzahl der Col1-positiven Zellen unter diesen, findet sich kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse zeigen keine relevante Beeinflussung der Kollagen-Synthese durch I-1c in Fibroblasten. Demgegenüber findet sich ein signifikant höheres Kollagensignal in eGFP-negativen/nicht transduzierten Zellen. Dieses lässt vermuten, dass die Virustransduktion selbst Einfluss auf das Expressionsmuster der Zellen hat.

3.6 Phosphorylierung von Regulatorproteinen wachstumsassoziierter Signaltransduktionswege durch konstitutiv aktiven Inhibitor-1

Es gibt Hinweise, dass β_2 -AR-Stimulation in Fibroblasten zur Aktivierung der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase 1/2*) führt. Die Aktivierung von MAP-Kinasen ist mit Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung verbunden (Keshet und Seger 2010, Pearson et al. 2001). Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob es sich dabei um einen cAMP/PKA-abhängigen Effekt handelt oder ob ein anderer cAMP-Effektor, Epac (*exchange protein activated by cAMP*), an der Aktivierung beteiligt ist. Es ist bisher auch noch unklar, welche pathophysiologische Konsequenz hinter dieser Aktivierung steht.

Zur Analyse des Einflusses von I-1 auf diesen Zweig der β -AR-Signalkaskade nimmt, wurden neben ERK1/2 potentielle Aktivatoren/Effektoren untersucht. Darunter die Kinase Akt (Proteinkinase B), der ERK1/2-Effektor p-90Rsk (90 kDa Ribosomale S6 Kinase) und dessen nachgeschalteter Effektor S6-ribosomales Protein (S6). Zur Ladekontrolle und Normalisierung wurde der *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) mit dem im verwendeten PathScan[®] Multiplex Wes-

tern Cocktail enthaltenen eIF4E-Antikörper untersucht. Bezogen auf p90RSK, Akt und p44/42 konnte kein Unterschied im Phosphorylierungsgrad zwischen I-1c-exprimierenden Fibroblasten und den Kontrollzellen detektiert werden (siehe Abb. 19). Bei Überexpression eines konstitutiv aktiven Protein-Phosphatase-Inhibitors wäre grundsätzlich mit einer Steigerung im Phosphorylierungsgrad spezifischer Proteine zu rechnen. Interessanterweise zeigten jedoch I-1c-exprimierende Zellen eine um ca. 35% reduzierte Phosphorylierung des S6-ribosomalen Proteins, einem Element der kleineren ribosomalen 40S-Untereinheit, deren Phosphorylierungsgrad mit einer erhöhten Translationsaktivität und damit Proteinsyntheserate korreliert (Peterson und Schreiber 1998). Neben p90RSK, das in Anwesenheit von I-1c in seiner Phosphorylierung und dementsprechend in seiner Aktivität unverändert war, können allerdings auch andere Kinasen wie z. B. die p70RSK S6 phosphorylieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass p-70RSK unabhängig von cAMP nach β_2 -AR-Stimulation über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) in Fibroblasten aktiviert wird und antagonisierend zu cAMP pro-proliferative Effekte auf die Zellen ausübte (Colombo et al. 2003). Zusammenfassend betrachtet scheint der I-1/PP-1-Komplex allerdings keine direkten Auswirkungen auf MAPK-Signalwege oder andere Wachstumsfaktor-abhängige Kinasen wie Akt zu haben.

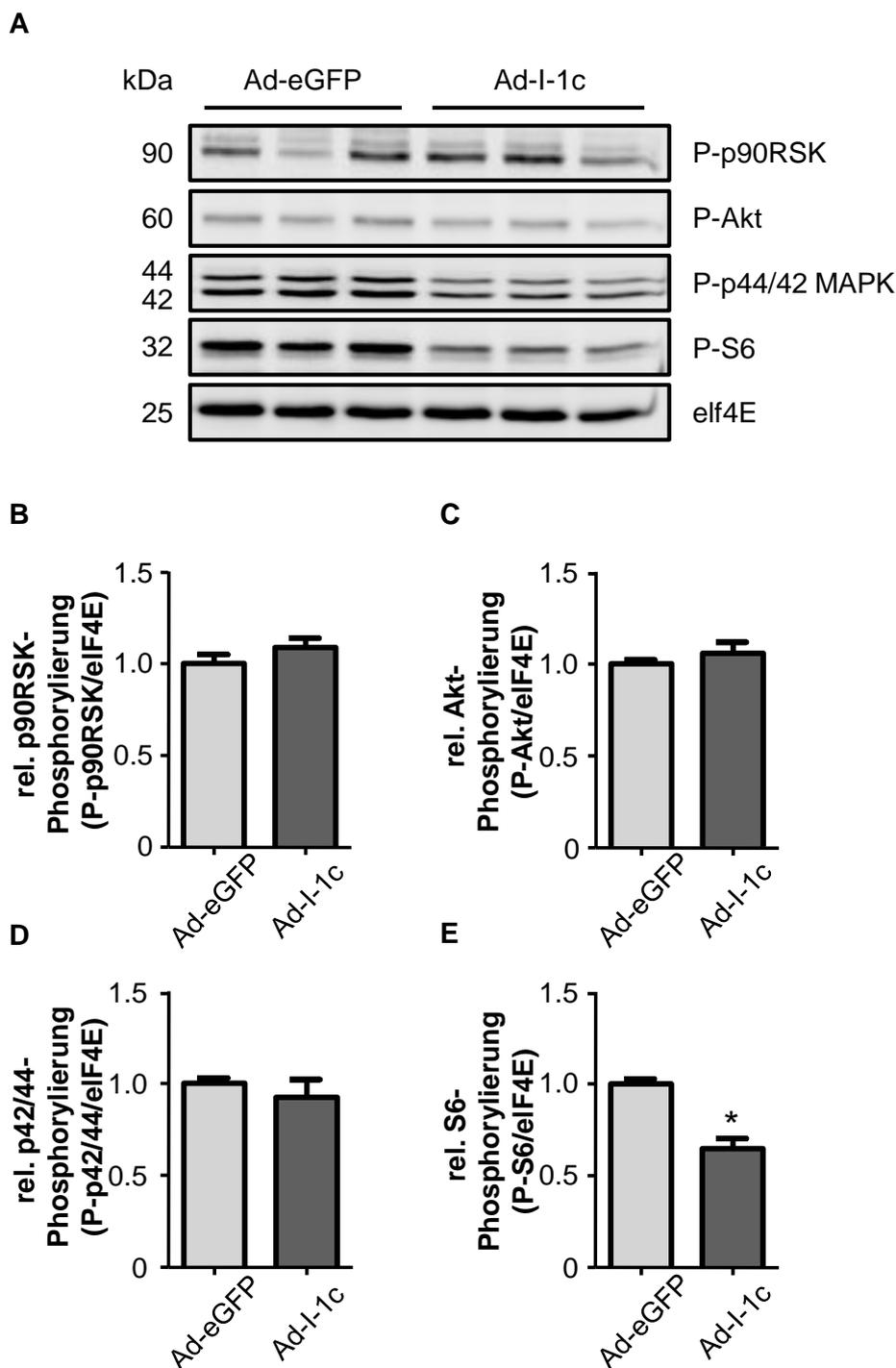


Abb. 19: Phosphorylierung von Regulatorproteinen Hypertrophie-assoziiierter Signaltransduktionswege. nRFB wurden bis zur Konfluenz in 6-Well-Platten inkubiert. 3 h vor Versuchsverwendung erfolgte die Serumdepletion. Anschließend erfolgte die Transduktion der Zellen mit Ad-eGFP oder Ad-I-1c im Transduktionsmedium über eine Dauer von 3 h. Nach Entfernen des Transduktionsmediums wurden die Zellen für weitere 24 – 48 h im Fibroblasten-Medium kultiviert. Die Zellen wurden in 150 μ l Lyse-Puffer lysiert. Die Phosphorylierung verschiedener Regulatorproteine (Phospho-p90RSK, Phospho-Akt, Phospho-p44/42, Phospho-s6 ribosomales Protein und eIF4E) wurden im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörper-Mix (PathScan[®]) im Immunoblot analysiert. Die Daten wurden auf eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) normalisiert. (A) Immunoblot zur Untersuchung der Auswirkung von I-1c auf die Phosphorylierung verschiedener Regulatorproteine. (B) – (E) Graphische Darstellung der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der in (A) erhobenen Daten. n=9. *p<0,05.

4 Diskussion

4.1 Grundlegende Etablierungen

Lange Zeit wurden Fibroblasten in der kardiovaskulären Forschung vernachlässigt – bis etwa Mitte der 1970er Jahre standen vornehmlich Kardiomyozyten im wissenschaftlichen Fokus (Daskalopoulos et al. 2012). Mit zunehmendem Interesse wurde ihre Rolle hinterfragt und ihre Bedeutung als wichtige Regulatoren der Herzfunktion allmählich erkannt (Nag 1980, Zak 1974). Fibroblasten bilden den zellulären Hauptbestandteil des Säugetierherzens (Camelliti et al. 2005). Aus heutiger Perspektive wissen wir, dass Fibroblasten elementare Funktionen (z. B. in der EZM-Homöostase, Signaltransduktion, Synthese von Botenstoffen; siehe Kap. 1.5) im Herzen erfüllen (Camelliti et al. 2005, Souders et al. 2009). Auch die Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben sich anfangs in erster Linie auf Kardiomyozyten konzentriert. Um in dieser Arbeit die Rolle der β -adrenergen Stimulation bzw. des Inhibitor-I in kardialen Fibroblasten analysieren zu können, waren zunächst elementare Etablierungen notwendig.

Es musste sichergestellt werden, dass unser Protokoll zur Zellpräparation neonataler Primärzellen (nach einer modifizierten Methode von Webster et al. 1993) auch tatsächlich nur schwach Kardiomyozyten-kontaminierte Fibroblastenkulturen hervorbringt. Es ließ sich auf Proteinebene CSQ als kardiomyozytenspezifisches Markerprotein in den Fibroblastenkulturen der Passage 1 (CSQ-Expression ca. 10% in nRFB, ca. 30% in nMFB) nachweisen. Erwartungsgemäß waren die Kulturen der frühen Passage schwach durch Kardiomyozyten kontaminiert, wobei sich die Kontamination für unsere Folgeversuche im akzeptablen Rahmen bewegte. Da Kardiomyozyten prinzipiell das Passagieren nicht tolerieren und als Folge absterben (Bouzeghrane und Thibault 2002, Villarreal et al. 1993), wäre es durchaus möglich gewesen, in späteren Passagen „reinere“ Kulturen hervorzubringen. Dieses hätte jedoch ungewollt die durch artifizielle Zellkultur bedingte Myofibroblasten-Transdifferenzierung begünstigt (Zunahme der α -SMA-Expression in höheren Passagen) und den Phänotyp der Fibroblasten verändert (Baum und Duffy 2011, Santiago et al. 2010), sodass die

Auswirkung auf die Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung nicht suffizient hätte untersucht werden können.

Die Supplementierung eines Basismediums mit Serum ist ein gängiges Standardverfahren, um kultivierten Zellen geeignete Zellkulturbedingungen für Wachstum und Proliferation zu bereiten (Gstraunthaler 2003). Aufgrund des breiten Spektrums an Inhaltsstoffen (Wachstumsfaktoren, Hormone, Vitamine, Lipide und weitere) besitzt Serum einen ausgeprägten Einfluss auf den zellulären Metabolismus und den Zellzyklus. Iyer *et al.* haben in einer interessanten Forschungsarbeit aus dem Jahr 1999 die Transkription von etwa 8600 menschlichen Genen in humanen Fibroblasten nach Versetzung mit 10% serumhaltigem Medium analysiert und gezeigt, dass Serum die Transkription einer Vielzahl unterschiedlichster Gene beeinflusst. Die Zugabe von Serum induzierte unter anderem die Expression profibrotischer Gene, welche Migration und Proliferation von Fibroblasten steuern (z. B. CTGF) oder die Differenzierung hin zu Myofibroblasten (z. B. Vimentin) fördern (Iyer *et al.* 1999). Auch Goppelt-Struebe *et al.* haben 2001 eine erhöhte CTGF-mRNA-Expression in Mesangiumzellen nach Serumzusatz beschrieben (Goppelt-Struebe *et al.* 2001).

Zur Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kardialen Fibroblasten wurde dem Basismedium fötales Kälberserum (FCS, 10%) hinzugefügt. Zur Ausschaltung FCS-vermittelter Stimuli wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 – 90% 3 h vor Versuchsverwendung vom Serum befreit, gespült und mit serumfreiem Medium versetzt. Inwieweit sich diese Bedingungen für proteinanalytische Untersuchungen von fibroseassoziierten Proteinen eignen, war zunächst unklar. Stimulation der so kultivierten Zellen mit ANP und SNP, deren antifibrotische Effekte aus der Literatur bekannt sind (Kataoka *et al.* 2002, Li *et al.* 2008, Tamura *et al.* 2000), führte zur signifikanten Verringerung der α -SMA-Expression, insbesondere unter SNP-Stimulation (Reduktion um ca. 70%). Es war also möglich, unter den gewählten Zellkulturbedingungen Veränderungen in der Expression Fibrose-assoziiierter Proteine zu detektieren.

Der in dieser Forschungsarbeit verwendete anti- α -SMA-Antikörper (Sigma-Aldrich: A 5228) wurde von unserer Arbeitsgruppe zuvor noch nicht eingesetzt. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich der für den Immunoblot von Fibroblastenlysaten optimalen Proteinladungsmenge und der Primär- und Sekundärantikörperkonzentration (Kim et al. 2015, Lal et al. 2014, Lehmann et al. 2011). Nach Sichtung der Literatur wurde initial eine Proteinmenge von 20 μ g, eine Primärantikörperkonzentration von 1:2.000 sowie eine Sekundärantikörperkonzentration von 1:5.000 gewählt. Unter diesen Bedingungen schien die Signalstärke bereits im Sättigungsbereich des Nachweissystems zu liegen. In Folgeversuchen konnten wir jedoch eine für unsere Fibroblastenlysate optimale Proteinladungsmenge von 2 μ g sowie eine optimale Konzentration des Erst- (1:2.000) und Zweitantikörpers (1:30.000) charakterisieren.

Die verwendeten Adenoviren (Ad-I-1, Ad-I-1c, Ad-eGFP) wurden von unserer Arbeitsgruppe bisher primär zur Transduktion von Kardiomyozyten eingesetzt (El-Armouche et al. 2006, El-Armouche et al. 2003 a). Aufgrund fehlender Erfahrung in der Transduktion kardialer Fibroblasten war zunächst unklar, welche *Multiplicity of Infection* (MOI) eine hohe Transduktionseffizienz bei gleichzeitig nur minimalen zytotoxischen Effekten erzielt. Eine ideale Balance zwischen diesen limitierenden Faktoren konnte für Ad-I-1 bei einer MOI von 100 und für Ad-I-1c sowie Ad-eGFP bei einer MOI von 300 gefunden werden. Die tatsächliche Überexpression der jeweiligen Zielproteine wurde anschließend im Immunoblot erfolgreich verifiziert. Aus vorherigen Experimenten war uns jedoch bekannt, dass Fibroblasten adenovirale Transduktion nicht gut tolerieren und es häufig zum vermehrten Absterben der transduzierten Zellen kommt. Dieses könnte Grund für die insgesamt nur schwache Transduktion der im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendeten Zellen sein. Hier zeigte sich ein nur geringer Anteil der analysierten Zellen als vital (gefärbter Nucleus) und eGFP-exprimierend nach Transduktion mit Ad-eGFP und Ad-I-1c.

4.2 Effekte β -adrenerger Stimulation auf kardiale Fibroblasten

Herzinsuffizienz gehört zu den häufigsten Krankheitsbildern der Industrienationen und besitzt eine ähnlich hohe Morbidität und Mortalität wie Malignomkrankungen (McMurray und Stewart 2000, Ponikowski et al. 2016). In der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist die Aktivierung des sympathischen Nervensystems von entscheidender Bedeutung. Freigesetzte Katecholamine stimulieren das Herz und können die reduzierte Herzfunktion kurzfristig kompensieren. Chronisch β -adrenerge Stimulation hingegen mündet in einem fatalen *circulus vitiosus* (siehe Kap. 1.2 und Kap. 1.4.1), welcher eine weitere Abnahme der Herzfunktion und einen Progress der Herzinsuffizienz zur Folge hat (El-Armouche und Eschenhagen 2009, Lympopoulos et al. 2013). Die Bedeutung der β -adrenergen Überstimulation in der Herzinsuffizienz kann auch im Kontext der Pharmakotherapie erkannt werden. Der Einsatz von β -Blockern reduziert die Herzinsuffizienz-assoziierte Mortalität signifikant (Bristow 2000), indem der Teufelskreis durchbrochen wird. Ein ausgesprochener Vorteil der β -Blockertherapie liegt in der Beeinflussung des kardialen *Remodelings*. β -Blocker hemmen kardiales *Remodeling* und können sogar eine Umkehr bewirken (Lowes et al. 2002, Mann und Bristow 2005, Mudd und Kass 2007). In einer Multizenterstudie aus dem Jahr 2004 (CARMEN) konnte dieser Effekt auch klinisch für den nicht-selektiven β -Blocker Carvedilol gezeigt werden (Remme et al. 2004). Obwohl Fibroblasten aufgrund ihrer EZM-regulierenden Funktion die „Effektorzellen“ des fibrotischen *Remodelings* darstellen, ist letztlich nur wenig über die Auswirkung chronischer β -adrenerger Stimulation auf kardiale Fibroblasten bekannt.

4.2.1 Isoprenalin-induzierte Effekte auf die Myofibroblasten-Transdifferenzierung

Das antifibrotische Potential von cAMP, einem *second messenger* innerhalb der β -adrenergen Signalkaskade, ist in der Literatur gut belegt (siehe Kap. 1.8). Vor diesem Hintergrund haben wir eine Beeinflussung der Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung bzw. der α -SMA-Expression in Isoprenalin-behandelten Zellen erwartet. Entgegen unserer Erwartungen hat die chronische Isoprenalin-Stimulation von Fibroblasten in unseren Experimenten die Transdifferenzierung

von Fibroblasten zu Myofibroblasten nicht beeinflusst. Ein möglicher Grund für unser Ergebnis könnte in der Zellkultivierung liegen. Während kardiale Fibroblasten im schlagenden Säugetierherzen in ein komplexes, vitales, dreidimensionales Netzwerk aus extrazellulärer Matrix und Kardiomyozyten eingebettet sind, befinden sich kultivierte Fibroblasten in einem isolierten, künstlichen, zweidimensionalen Umfeld und sind artifiziell Stress (beispielsweise durch die Plastikoberfläche der Zellkulturschale, Passagieren oder Mediumwechsel) ausgesetzt. Es ist bekannt, dass artifizielle Kulturbedingungen die Myofibroblasten-Transdifferenzierung und somit eine erhöhte α -SMA-Expression in Fibroblastenkulturen induzieren. Die *In-vitro*-Myofibroblasten-Transdifferenzierung wurde 2010 ausgiebig von Santiago *et al.* untersucht. Sie konnten zeigen, dass zweidimensional-kultivierte Fibroblasten zunehmend Myofibroblasten-typische Proteine exprimieren und sich zu Myofibroblasten differenzieren. Diese Beobachtung wird durch Baum und Duffy bestärkt, welche zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen sind (Baum und Duffy 2011). Es wäre gut denkbar, dass die externe Aktivierung der β -adrenergen Signalkaskade in Fibroblasten über Isoprenalin nicht potent genug ist, die bereits deutlich erhöhte α -SMA-Expression in den von uns untersuchten Zellen umzukehren.

Auf der anderen Seite konnten wir zeigen, dass es durchaus möglich ist, in den von uns gewählten Bedingungen eine Beeinflussung der Myofibroblasten-Transdifferenzierung zu detektieren. Stimulation der Fibroblasten mit den cGMP-Signalweg-aktivierenden Substanzen ANP (Aktivator der membranständigen Guanylylcyclase-A) und Nitroprussid-Natrium (NO-Donor) führte zur signifikanten Reduktion der α -SMA-Expression. Eine Publikation unserer Arbeitsgruppe untermauert das ausgeprägte antifibrotische Potential von cGMP (Vettel *et al.* 2014). Nach Überexpression der cAMP- und cGMP-hydrolysierenden und über cGMP-aktivierten Phosphodiesterase 2 ließ sich über Senkung basaler cAMP-Spiegel zunächst eine gesteigerte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (gesteigerte α -SMA-Expression) beobachten – diese Effekte konnten jedoch über Steigerung der cGMP-Synthese durch ANP und Nitroprussid-Natrium wiederum signifikant umgekehrt werden.

4.3 Inhibitor-1 in kardialen Fibroblasten

Inhibitor-1 wird im Zytosol verschiedener Säugetiergewebe exprimiert (Herzig und Neumann 2000). Nach seiner Entdeckung im Jahre 1976 war anfangs unklar, ob endogener I-1 auch in kardialem Gewebe präsent ist. Heute wissen wir von seiner kardialen Expression, wenngleich endogener I-1 im Herzen nur schwach exprimiert wird (Gupta et al. 1996, Neumann et al. 1997, Neumann et al. 1991). Die Expression von I-1 in kardialem Gewebe wurde erstmalig 1988 von Iyer *et al.* in Meerschweinchenventrikeln bzw. von Ahmad *et al.* 1989 in Rattenherzen beschrieben. Gupta *et al.* waren die Ersten, die I-1 in isolierten Kardiomyozyten des Meerschweinchens nachgewiesen haben. Bis heute ist unklar, ob und in welcher Relation endogener I-1 in kardialen Fibroblasten exprimiert wird.

Wir konnten anhand unserer Expressionsdaten erstmals zeigen, dass I-1 auf mRNA-Ebene in kardialen Fibroblasten der neonatalen und adulten Maus, der neonatalen Ratte und des adulten Menschen exprimiert wird. Im Vergleich untereinander zeigten sich die höchsten I-1-mRNA-Spiegel in neonatalen Mausfibroblasten, während adulte, humane Fibroblasten die geringsten mRNA-Spiegel an I-1 aufwiesen (relative mRNA-Spiegel an I-1 in nMFB: ca. 20x höher im Vergleich zu nRFB; ca. 200x höher im Vergleich zu aHuFB). In Anbetracht seiner funktionellen Relevanz im β -adrenergen Signalweg, insbesondere in adulten, differenzierten Kardiomyozyten, ist die geringere Expression von I-1 in kardialen Fibroblasten wenig verwunderlich. Interessanterweise unterscheidet sich das Verhältnis der endogenen I-1-Expression zwischen kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten speziesspezifisch. Während in der neonatalen Ratte I-1 stärker in Kardiomyozyten als in kardialen Fibroblasten exprimiert wird, findet sich in neonatalen Mäusen eine höhere I-1-Expression in kardialen Fibroblasten als in Kardiomyozyten. Vergleicht man die neonatalen Mausdaten mit Daten adulter Tiere, so lässt sich ein gegensätzliches Expressionsmuster erkennen. In Herzen adulter Mäuse liegt, verglichen mit Fibroblasten, eine höhere I-1-Expression in Kardiomyozyten vor.

I-1 stellt einen spezifischen Inhibitor der Protein-Phosphatase-1 dar und ist als Verstärkerlement in die β -adrenerge Signalkaskade eingebettet (El-Armouche et

al. 2003 a). Voraussetzung für die Entfaltung seiner inhibitorischen Funktion ist die PKA-abhängige Phosphorylierung des N-terminalen Thr35, welche I-1 in seine aktive Form überführt (Endo et al. 1996). Es ist bekannt, dass Isoprenalin-Stimulation zur Hyperphosphorylierung von I-1 im Meerschweinchenmyokard und in Kardiomyozytenpopulationen führt (Ahmad et al. 1989, Gupta et al. 1996, Neumann et al. 1991).

Ob I-1 in kardialen Fibroblasten ebenfalls der β -adrenergen Aktivierung unterliegt, wurde bisher nicht untersucht. Wir konnten erstmals zeigen, dass überexprimierter I-1 in Fibroblasten konzentrationsabhängig durch Isoprenalin-Stimulation hyperphosphoryliert wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass I-1 in kardialen Fibroblasten ebenfalls in den β -adrenergen Transduktionsweg eingebettet ist. Diese interessanten Daten führten zu der Frage nach dem vermittelnden β -Adrenozeptor-Subtypen. Wir konnten in einem Experiment mit selektiver Blockade von β_1 -AR (Blockade via CGP 20712) respektive β_2 -AR (Blockade via ICI 118,551) in kardialen Fibroblasten belegen, dass der in Fibroblasten prädominante β_2 -AR-Subtyp (Gustafsson und Brunton 2000) die Aktivierung/Phosphorylierung von I-1 mediiert. Die exklusive Stimulation von β_1 -AR führte zu keinen signifikanten Effekten auf die I-1-Phosphorylierung. Katecholamine stimulieren kardiale Fibroblasten also über β_2 -Adrenozeptoren - dieses Ergebnis fügt sich gut in die Datenlage ein. Turner *et al.* (2003) haben in Stimulationsversuchen gezeigt, dass β_2 -AR in kardialen Fibroblasten die Isoprenalin-abhängige Aktivierung sowohl der Adenylylcyclase, als auch der p44/42-mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) vermitteln. Auch Gustafsson und Brunton (2000) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie haben gezeigt, dass die Isoprenalin-induzierte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Fibroblasten über β_2 -AR verläuft. In keiner der beiden Forschungsarbeiten konnte eine Beteiligung von β_1 -AR in der β -adrenergen Signaltransduktion in Fibroblasten nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer Untersuchung zur Beeinflussung von Regulatorproteinen wachstumsassoziierter Signaltransduktionswege durch I-1 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des S6-ribosomalen Proteins, einem Element der ribosomalen 40S-Untereinheit, dessen Phosphorylierungsgrad mit einer erhöhten

Proteinsyntheserate und Translationsaktivität korreliert (Dufner und Thomas 1999, Volarevic und Thomas 2001), in I-1c-überexprimierenden Fibroblasten herunterreguliert war (ca. 35%). Dieses war insofern bemerkenswert, da bei Überexpression eines Protein-Phosphatase-Inhibitors prinzipiell mit einem gesteigerten Phosphorylierungsgrad spezifischer Zielproteine zu rechnen gewesen wäre und S6-ribosomales Protein kein direktes I-1/Protein-Phosphatase-1-Zielprotein darzustellen scheint. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte in einem *crossstalk* zwischen inhibierter Protein-Phosphatase-1 und S6-ribosomalen Protein-regulierenden Kinasen/Phosphatasen liegen. Es ist z. B. bekannt, dass Protein-Phosphatase-2B (Calcineurin) und Protein-Phosphatase-2A indirekt die Aktivität der Protein-Phosphatase-1 über die Dephosphorylierung von I-1 Threonin 35 erhöhen. Es wäre daher denkbar, dass unter basalen Bedingungen durch I-1 inhibierte Protein-Phosphatase-1 S6-regulierende Phosphatasen aktiviert oder S6-phosphorylierende Kinasen inhibiert werden. Darüber hinaus scheint I-1/PP-1-Komplex jedoch keine direkten Effekte auf die von uns untersuchten wachstumsassoziierten Signalwege zu besitzen.

Welchen Einfluss übt I-1 auf die kardiale Fibrose aus? Frühere Daten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass I-1-*knock out*-Mäuse im Vergleich zu I-1-transgenen (herzspezifische Überexpression) und Wildtyp-Tieren vor der Ausbildung einer Isoprenalin-induzierten kardialen Fibrose geschützt sind (El-Armouche et al. 2008). Inwieweit I-1 kardiale Fibroblasten profibrotisch stimuliert, ist nicht bekannt. Wir konnten auf Proteinlevel interessanterweise zeigen, dass I-1c-überexprimierende Fibroblasten eine erhöhte Expression des Myofibroblastentypischen und profibrotischen Markerproteins α -SMA (~39%) aufweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass I-1 die Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung, einen Prozess der essentiell für die Entwicklung einer kardialen Fibrose ist (überschießende Sekretion von EZM-Proteinen durch sekretorisch aktive Myofibroblasten) (Kong et al. 2014, Leask 2010), prinzipiell begünstigen könnte.

Analog dazu ließ sich eine mäßig vermehrte, zellmembrannahe Stressfaserformation in Ad-I-1c-transduzierten Fibroblasten abgrenzen. Auch die Expression von CTGF, einem zentralen Mediator der Fibrose und des *Remodelings* in unterschiedlichen Geweben (Lipson et al. 2012), war in I-1c-transduzierten Fibroblasten der neonatalen Ratte moderat erhöht. Die CTGF-Expressionssteigerung war zwar nicht signifikant, deutet jedoch in Zusammenschau der Ergebnisse ebenfalls auf profibrotische Effekte von I-1 hin. Demgegenüber stehen die Daten der Experimente zum Einfluss von I-1c auf den Kollagenhaushalt. Kardiale Fibrose ist *per se* als exzessive Akkumulation von fibrillärem Kollagen im Myokard (insbesondere Kollagen Typ I und III) definiert. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, welche I-1c eher eine profibrotische Funktion zuschreiben, wäre zu erwarten gewesen, dass Überexpression von I-1c zu einer gesteigerten Synthese von fibrillärem Kollagen Typ I bzw. seinem Präkursorprotein Prokollagen $\alpha 1$ Typ I führt. Erstaunlicherweise ließ sich dieses jedoch weder auf Proteinebene noch durchflusszytometrisch nachweisen. Ein Grund hierfür könnte in der Zelltransduktion mit den eGFP-gekoppelten Adenoviren (Ad-eGFP, Ad-I-1c – kodiert über separaten CMV-Promotor neben I-1c-Konstrukt ebenfalls für eGFP) liegen.

Die Verwendung von GFP bzw. eGFP als Marker unterschiedlichster Proteine stellt eine gängige Labormethode in zellbiologischen Versuchen dar (Chalfie et al. 1994) und basiert auf der Annahme, dass GFP bzw. eGFP Zellen nicht relevant beeinflusst (Baens et al. 2006). In der Literatur sind jedoch Effekte von GFP und GFP-Derivaten auf zelluläre Prozesse beschrieben. So wurde in einer DNA-Microarray-Analyse gezeigt, dass GFP-Expression in Kardiomyozyten die Expression von 212 Genen beeinflusst, welche eine Rolle im Zellmetabolismus, in der Zellantwort auf Stimuli oder in der Zellkommunikation spielen (Badrian und Bogoyevitch 2007). Ebenso wurde in MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebszelllinie) eine Veränderung der Expression von Proteinen, welche mit Proteinfaltung, Organisation des Zytoskeletts und zellulärer Immunantwort assoziiert sind, durch GFP-Expression nachgewiesen (Coumans et al. 2014). Es wäre denkbar, dass die übermäßige Expression von eGFP in kardialen Fibroblasten die Prozessierung bzw. die Proteinfaltung von Kollagen nachteilig beeinflusst und als Antwort auf fehlerhaft gefaltete Proteine ein gesteigerter Abbau dieser induziert wird

(Coumans et al. 2014, Schroder und Kaufman 2005). Diese Überlegung kann durch die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse (signifikant höheres Kollagensignal in eGFP-negativen/nicht transduzierten Zellen gegenüber eGFP-positiven/transduzierten Zellen) gestützt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die vorliegend fehlende Beeinflussung der Kollagen-Expression könnte im cAMP-Signalweg selbst liegen. Nachdem lange Zeit angenommen wurde, cAMP entfalte seine Wirkung exklusiv über die Aktivierung der PKA und über PKA-medierte Veränderungen in der Proteinexpression (Cohen 2002, Zambon et al. 2005), ist heute bekannt, dass cAMP ebenso PKA-unabhängig über Epac (*exchange protein activated by cAMP*) Effekte vermittelt (Bos 2003, de Rooij et al. 1998, Insel et al. 2012 b, Kawasaki et al. 1998, Roscioni et al. 2008, Schinner et al. 2015, Yokoyama et al. 2008). Es ist jedoch nicht bekannt, welche PKA-abhängigen Phosphorylierungen Fibrose-assoziiierter Zielproteine in Fibroblasten letztlich über I-1 stabilisiert werden. Es wäre möglich, dass I-1 die Dephosphorylierung von PKA-Zielproteinen inhibiert, welche kaum oder mitunter auch nicht an der Vermittlung basaler antifibrotischer Effekte von cAMP/PKA beteiligt sind und sich daher keine Beeinflussung der Kollagen-Expression nachweisen ließ.

Auch wenn sich antifibrotische Effekte durch cAMP beobachten ließen (Senkung basaler cAMP-Spiegel durch Überexpression der cAMP- und cGMP-hydrolysierenden, cGMP-aktivierten PDE2 führte zur Hochregulierung der α -SMA-Expression / Steigerung der Myofibroblasten-Transdifferenzierung), scheint das antifibrotische Potential von cGMP in Fibroblasten zu überwiegen (signifikante Reduktion der α -SMA-Expression / Umkehr der Myofibroblasten-Transdifferenzierung durch Erhöhung der cGMP-Spiegel in PDE2-überexprimierenden Fibroblasten) (Vettel et al. 2014). Betrachtet man den in den Leitlinien empfohlenen klinischen Einsatz von β -Blockern in der Herzinsuffizienz, so wird diese Annahme gestärkt. Trotz Senkung basaler cAMP-Spiegel wirkt sich die Therapie mit β -Blockern positiv auf kardiales *Remodeling* aus, kann sogar reverses *Remodeling* bewirken (Frigerio und Roubina 2005, Lowes et al. 2002, Mann und Bristow 2005, Mudd und Kass 2007) und führt eben nicht in die

Herzfibrose. Anscheinend wird das prinzipiell reduzierte antifibrotische Potential durch gesenkte cAMP-Spiegel gut kompensiert – der cGMP-Signalweg scheint hierbei von großer Bedeutung zu sein. Einige Daten deuten bereits darauf hin, dass die Modulation des cGMP-*signalings* eine vielversprechende Therapieoption im Kontext der Herzinsuffizienz darstellen könnte (Boerrigter et al. 2009).

5 Zusammenfassung

Herzinsuffizienz gehört zu den häufigsten internistischen Krankheitsbildern in den Industrienationen und besitzt eine ähnlich hohe Mortalität wie Malignomerkrankungen. Pathophysiologisch spielt das sympathische Nervensystem eine zentrale Rolle im insuffizienten Herzen. Während zunächst die Aktivierung der β -adrenergen Signalkaskade über die Freisetzung der Transmitter Adrenalin und Noradrenalin die kardiale Reserve ausschöpft und den Kreislauf aufrecht erhält, führt chronische β -adrenerge Aktivierung in einen pathophysiologischen *circulus vitiosus* und somit zu einer zunehmenden Verschlechterung der Herzfunktion. Kardiales *Remodeling* und durch dauerhaft erhöhte Katecholaminspiegel induzierte Herzfibrose sind hierbei von großer Bedeutung. Der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) ist selbst Element innerhalb des β -adrenergen Signalweges und distal des cAMP-Levels eingebettet. I-1 besitzt die Funktion eines Verstärkers. Durch Proteinkinase A an Threonin 35 (Thr35) phosphorylierter und hierüber aktivierter I-1 hemmt spezifisch die Protein-Phosphatase-1 und inhibiert so indirekt die Dephosphorylierung von β -adrenergen Regulatorproteinen. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass *I-1-knock-out*-Mäuse vor der Entwicklung einer Myokardfibrose nach chronischem β -adrenergen Stress geschützt waren. Extrazelluläre Matrix-regulierende kardiale Fibroblasten und die sekretorisch aktiveren Myofibroblasten sind dabei die zentralen Effektorzellen in der kardialen Fibrose. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit die Expression fibroseassoziiierter Proteine durch chronische β -adrenerge Stimulation, insbesondere durch Überexpression einer konstitutiv aktiven I-1-Mutante (I-1c), beeinflusst wird.

Anhand von Expressionsdaten konnten wir erstmals zeigen, dass I-1 auf mRNA-Ebene in kardialen Fibroblasten der neonatalen und adulten Maus (nMFB, aMFB), der neonatalen Ratte (nRFB) und des adulten Menschen (aHuFB) exprimiert wird. Während sich die höchsten I-1-mRNA-Spiegel in neonatalen Mausfibroblasten nachweisen ließen, fanden sich die geringsten mRNA-Spiegel in adulten Menschen (relative mRNA-Spiegel an I-1 in nMFB: ca. 20x höher im Vergleich zu nRFB; ca. 200x höher im Vergleich zu aHuFB). Dabei unterschied sich interessanterweise das Verhältnis der endogenen I-1-Expression zwischen

Fibroblasten und Kardiomyozyten speziesspezifisch. In der neonatalen Ratte wird I-1 stärker in Kardiomyozyten exprimiert, in der neonatalen Maus hingegen zeigt sich eine höhere Expression von I-1 in Fibroblasten. Es ist bekannt, dass I-1 in Kardiomyozyten der β -adrenergen Aktivierung unterliegt und über PKA-abhängige Phosphorylierung am N-terminalen Thr35 in seine inhibitorisch aktive Form überführt wird. Wir konnten auf Proteinlevel erstmals nachweisen, dass in kardialen Fibroblasten überexprimierter I-1 durch β -adrenerge Stimulation konzentrationsabhängig hyperphosphoryliert wird. Hierauf aufbauend konnten β_2 -Adrenozeptoren als I-1-aktivierender β -Adrenozeptor-Subtyp in kardialen Fibroblasten charakterisiert werden. Dabei führte die selektive Blockade von β_2 -Adrenozeptoren zur Inhibition des Katecholamin-induzierten Anstiegs der I-1-Phosphorylierung. Entgegen unserer Erwartung konnten wir keine Beeinflussung der Fibroblasten-Myofibroblasten-Transdifferenzierung auf Proteinebene nach Katecholaminstress beobachten. Ein Grund hierfür könnte in der aus der Literatur bekannten *In-vitro*-Myofibroblasten-Transdifferenzierung durch artifizielle Zellkulturbedingungen liegen. I-1 scheint jedoch die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, einen für die Entstehung der kardiale Fibrose essentiellen Prozess, zu begünstigen. So konnte im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine gesteigerte α -SMA-Expression (~39%) in I-1c-überexprimierenden Fibroblasten gezeigt werden. Analog dazu ließ sich unter dem Konfokalmikroskop eine tendenziell vermehrte zellmembrannaher Stressfaserformation in I-1c-transduzierten Fibroblasten abgrenzen. Auch die Expression von CTGF, einem zentralen Mediator der Fibrose und des *Remodelings*, stellte sich in I-1c-überexprimierenden Fibroblasten moderat erhöht dar. Demgegenüber ließ sich in I-1c-transduzierten Fibroblasten keine gesteigerte Expression von Kollagen Typ I bzw. seines Präkursorproteins Prokollagen $\alpha 1$ Typ I nachweisen.

In Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich I-1 als ein Element innerhalb der β -adrenergen Signalkaskade in kardialen Fibroblasten charakterisieren und scheint über bisher nicht geklärte Mechanismen profibrotische Einflüsse auf kardiale Fibroblasten auszuüben. Im Kontext der Herzinsuffizienz könnte die therapeutische Modulation von I-1, insbesondere seine Inhibition, vorteilhafte Effekte auf kardiales *Remodeling* und Herzfibrose besitzen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
A	Adenin
AC	Adenylylcyclase
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ad	Adenovirus
aHuFB	adulte humane (kardiale) Fibroblasten
Akt	Proteinkinase B
aMFB	adulte (kardiale) Mausfibroblasten
aMKM	adulte Mauskardiomyozyten
ANP	atriales natriuretisches Peptid
anti-g	<i>anti-goat</i> , anti-Ziege
anti-m	<i>anti-mouse</i> , anti-Maus
anti-r	<i>anti-rabbit</i> , anti-Kaninchen
AS	Aminosäure
AT II	Angiotensin II
AT1-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1
AV-Knoten	Atrioventrikular-Knoten
β -AR	β -Adrenozeptoren
β -ARK1	β -Adrenozeptor-Kinase
baV	biologisch aktive Viruspartikel
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Calcium- und Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBFHH	Calcium- und Bicarbonat-freier Hanks-Puffer mit HEPES
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CGP	CGP 20712 Dihydrochlorid

CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1	Kollagen Typ I
COOH	Carboxygruppe
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CSQ	Calsequestrin
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Ctr	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECT	<i>engineered connective tissue</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i> , eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E
EHM	<i>engineered heart muscle</i>
Epac	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERK 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ET-1	Endothelin
EZM	extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblasten
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	<i>forward primer</i> , Vorwärts-Primer (5'-3')
FSC	<i>forward-scattered light</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
g-anti-m	Anti-Maus, produziert in der Ziege
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-A	Guanylatcyclase-A

G _i -Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein-gekoppelt, inhibitorisches G-Protein
GRK5	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 5
G _s -Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein-gekoppelt, stimulierendes G-Protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i> , Hyperpolarisations-aktiviert und durch cyclische Nucleotide-reguliert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hu	Mensch
I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
I-1c	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1-T35D
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	ICI 118,551 Hydrochlorid
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Iso	Isoprenalin
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
KFB	kardiale Fibroblasten
KM	Kardiomyozyten
KO	Knock-out
LTCC	L-Typ-Calciumkanal
LTP	<i>long-term potentiation</i> , Langzeit-Potenzierung
m	Maus
m	Meter
M	Mol/l
m/v	Masse/Volumen
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEM NEAA	<i>minimum essential medium non-essential amino acids</i>
mk	monoklonal
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
MP	Milchpulver

MPF	<i>maturation promoting factor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein-C
MyoFB	Myofibroblasten
Na ⁺	Natrium
NA	Nordadrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nFB	neonatale Fibroblasten
NH ₂	Aminogruppe
nKM	neonatale Kardiomyozyten
NKM	Nicht-Kardiomyozyten
nMFB	neonatale (kardiale) Mausfibroblasten
nMKM	neonatale Mauskardiomyozyten
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nRFB	neonatale (kardiale) Rattenfibroblasten
nRKM	neonatale Kardiomyozyten
N-terminal	Amino-terminal
NYHA	New York Heart Association
P	Passage
P44/42 MAPK	ERK1/2
P70RSK	70 kDa ribosomale S6-Kinase
p90RSK	90 kDa ribosomale S6-Kinase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pk	polyclonal
PKA	Proteinkinase A
PKC α	Proteinkinase C α
PKG	Proteinkinase G

PLB	Phospholamban
PLM	Phospholemman
POX	Meerrettichperoxidase gekoppelt
PP-1	Protein-Phosphatase-1
PP-2A	Protein-Phosphatase-2A
PP-2B	Protein-Phosphatase-2B (Calcineurin)
Pro-Col1a1	Prokollagen α 1 Typ I
qPCR	quantitative PCR
r	Ratte
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalkraft
rek	rekombinant
rel	relativ
rev	<i>reverse primer</i> , Rückwärts-Primer (3'-5')
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROX	X-Rohdamin
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RyR2	sarkoplasmatischer Ryanodinrezeptor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardabweichung des Mittelwerts
Ser67	Serin 67
SERCA2a	sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
SNP	<i>sodium nitroprusside</i> , Nitroprussid-Natrium
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	<i>side-scattered light</i> , Seitwärtsstreulicht
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	<i>tris-buffered saline</i> + Tween [®] 20, Tris-gepufferte Salzlösung + Tween [®] 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid

TG	transgen
TGF β	<i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
Thr35	Threonin 35
Thr75	Threonin 75
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tnl	Troponin I
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocynat
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp

Si-Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
f	Femto (10^{-15})

7 Literaturverzeichnis

Adams JC (1995): Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci* 108 (Pt 5), 1977-1990

Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS, Watanabe AM (1989): Autonomic Regulation of Type 1 Protein Phosphatase in Cardiac Muscle. *J. Biol. Chem* 264, 3859-3863

Allen PB, Hvalby O, Jensen V, Errington ML, Ramsay M, Chaudhry FA, Bliss TV, Storm-Mathisen J, Morris RG, Andersen P (2000): Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci* 20, 3537-3543

Anderson KR, Sutton MG, Lie JT (1979): Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 128, 79-85

Badrian B, Bogoyevitch MA (2007): Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression. *DNA Cell Biol* 26, 727-736

Baens M, Noels H, Broeckx V, Hagens S, Fevery S, Billiau AD, Vankelecom H, Marynen P (2006): The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS ONE* 1, e54

Baltimore D (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211

Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996): Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157, 171-179

Baum J, Duffy HS (2011): Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 57, 376-379

Bers DM (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205

Bers DM (2008): Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70, 23-49

Beyer C, Zenzmaier C, Palumbo-Zerr K, Mancuso R, Distler A, Dees C, Zerr P, Huang J, Maier C, Pachowsky ML (2015): Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling. *Ann Rheum Dis* 74, 1408-1416

- Biel M, Schneider A, Wahl C (2002): Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 12, 206-212
- Bishop JE, Lindahl G (1999): Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res* 42, 27-44
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998): Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280, 1940-1942
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA (1997): Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96, 1495-1500
- Boerrigter G, Lapp H, Burnett JC (2009): Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm. *Handb Exp Pharmacol* 485-506
- Bohm M, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Nabauer M, Kemkes B, Erdmann E (1988): Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *Eur Heart J* 9, 844-852
- Bonnefont-Rousselot D, Mahmoudi A, Mougnot N, Varoquaux O, Le Nahour G, Fouret P, Lechat P (2002): Catecholamine effects on cardiac remodelling, oxidative stress and fibrosis in experimental heart failure. *Redox Rep* 7, 145-151
- Bos JL (2003): Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 733-738
- Boudina S, Abel ED (2007): Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115, 3213-3223
- Bouzeghrane F, Thibault G (2002): Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res* 53, 304-312
- Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA (2010): The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 48, 474-482
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB (2004): PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10, 248-254

Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F (2011): Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal* 23, 1257-1266

Brilla CG, Zhou G, Rupp H, Maisch B, Weber KT (1995): Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol* 76, 8D-13D

Bristow MR (2000): beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101, 558-569

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

Brodde OE, Michel MC (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651-690

Brodde OE, Bruck H, Leineweber K (2006): Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* 100, 323-337

Brouri F, Hanoun N, Mediani O, Saurini F, Hamon M, Vanhoutte PM, Lechat P (2004): Blockade of beta 1- and desensitization of beta 2-adrenoceptors reduce isoprenaline-induced cardiac fibrosis. *Eur J Pharmacol* 485, 227-234

Brower GL, Janicki JS (2001): Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H674-683

Brown GP, Blitzler RD, Connor JH, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (2000): Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J Neurosci* 20, 7880-7887

Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005): The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 657-687

Brunner-La Rocca HP, Kaye DM, Woods RL, Hastings J, Esler MD (2001): Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* 37, 1221-1227

Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 2. Auflage. Version 2. 2017. DOI: 10.6101/AZQ/000390.

Bustin SA (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193

Buxton IL, Brunton LL (1985): Direct analysis of beta-adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. *Circ Res* 56, 126-132

Camelliti P, Borg TK, Kohl P (2005): Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65, 40-51

Campbell SE, Katwa LC (1997): Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1947-1958

Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P (2002): Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22, 4124-4135

Ceulemans H, Bollen M (2004): Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84, 1-39

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805

Chan EC, Dusting GJ, Guo N, Peshavariya HM, Taylor CJ, Dilley R, Narumiya S, Jiang F (2010): Prostacyclin receptor suppresses cardiac fibrosis: role of CREB phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 49, 176-185

Chen B, Li A, Wang D, Wang M, Zheng L, Bartles JR (1999): Espin contains an additional actin-binding site in its N terminus and is a major actin-bundling protein of the Sertoli cell-spermatid ectoplasmic specialization junctional plaque. *Mol Biol Cell* 10, 4327-4339

Chen HH, Burnett Jr JC (2006): Clinical application of the natriuretic peptides in heart failure. *Eur Heart J Suppl* 8, E18-E25

Chien W, O'Kelly J, Lu D, Leiter A, Sohn J, Yin D, Karlan B, Vadgama J, Lyons KM, Koeffler HP (2011): Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int J Oncol* 38, 1741-1747

Chilton L, Giles WR, Smith GL (2007): Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J Physiol* 583, 225-236

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299

CIBIS-II-Studie (1999): The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 353(9146), 9-13

Cohen P (2002): Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1, 309-315

Cohen PT (2002): Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241-256

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000): Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35, 569-582

Colombo F, Gosselin H, El-Helou V, Calderone A (2003): Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP. *J Cell Physiol* 195, 322-330

Colucci WS, Denniss AR, Leatherman GF, Quigg RJ, Ludmer PL, Marsh JD, Gauthier DF (1988): Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. Dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest* 81, 1103-1110

Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369-374

Corda S, Samuel JL, Rappaport L (2000): Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 5, 119-130

Coumans JV, Gau D, Poljak A, Wasinger V, Roy P, Moens P (2014): Green fluorescent protein expression triggers proteome changes in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 320, 33-45

Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ (1997): Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol* 136, 1287-1305

- D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, Schulz R, Heusch G, Onody A, Ferdinandy P, Baxter GF (2003): B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1592-1600
- Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA (2009): Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 321-338
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G (1990): Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63, 21-29
- Daskalopoulos EP, Janssen BJ, Blankesteyn WM (2012): Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc Microanal* 18, 35-49
- Davaille J, Gallois C, Habib A, Li L, Mallat A, Tao J, Levade T, Lotersztajn S (2000): Antiproliferative properties of sphingosine 1-phosphate in human hepatic myofibroblasts. A cyclooxygenase-2 mediated pathway. *J Biol Chem* 275, 34628-34633
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998): Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477
- de Sa DD, Chen HH (2008): The role of natriuretic peptides in heart failure. *Curr Cardiol Rep* 10, 182-189
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J (2000): Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F400-416
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005): Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13, 7-12
- Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia LG, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM (2005): Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res* 97, 252-259
- Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B (2001): Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 60, 577-583
- Dewenter M, Vettel C, El-Armouche A (2014): The Janus face of BNP therapy in chronic heart failure: beneficial effects unmasked by beta blockers? *Heart* 100, 819-820

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martin-Vasallo P, Diaz-Flores L, Jr. (2009): Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* 24, 909-969

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW (2008): ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 10, 933-989

Dorn GW, 2nd, Molkentin JD (2004): Manipulating cardiac contractility in heart failure: data from mice and men. *Circulation* 109, 150-158

Dufner A, Thomas G (1999): Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 253, 100-109

Dziadzio M, Usinger W, Leask A, Abraham D, Black CM, Denton C, Stratton R (2005): N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *QJM* 98, 485-492

Eghbali M (1992): Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 87: 2, 183-189

Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D (1997): Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 16, 1876-1887

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

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J (2003 a): Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17, 437-439

El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T (2003 b): Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc Res* 60, 478-487

El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004): Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61, 87-93

- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminer T, Ditz D, Didie M, Dobrev D, Eschenhagen T (2006): Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 700-706
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L (2007): Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43, 223-229
- El-Armouche A, Wittkopper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didie M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsold B (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80, 396-406
- Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG, Shenolikar S (1990): Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 265, 13415-13418
- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S (1996): Multiple Structural Elements Define the Specificity of Recombinant Human Inhibitor-1 as a Protein Phosphatase-1 Inhibitor. *Biochemistry* 35, 5220-5228
- Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ (1996): Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 27, 146-154
- Eschenhagen T (2008): Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14, 485-487
- Factor SM, Bhan R, Minase T, Wolinsky H, Sonnenblick EH (1981): Hypertensive-diabetic cardiomyopathy in the rat: an experimental model of human disease. *Am J Pathol* 102, 219-228
- Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z (2012): Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 15
- Faulx MD, Ernsberger P, Vatner D, Hoffman RD, Lewis W, Strachan R, Hoit BD (2005): Strain-dependent beta-adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H30-36

Feldman MD, Copelas L, Gwathmey JK, Phillips P, Warren SE, Schoen FJ, Grossman W, Morgan JP (1987): Deficient production of cyclic AMP: pharmacologic evidence of an important cause of contractile dysfunction in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 75, 331-339

Foulkes JG, Jefferson LS, Cohen P (1980): The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin. *FEBS Lett* 112, 21-24

Francis GS, Tang WH (2003): Pathophysiology of congestive heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 4 Suppl 2, S14-20

Frigerio M, Roubina E (2005): Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. *Am J Cardiol* 96, 10L-18L

Gabbiani G (1996): The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 192, 708-711

Gabbiani G (2003): The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200, 500-503

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G (1971): Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27, 549-550

Gao X, He X, Luo B, Peng L, Lin J, Zuo Z (2009): Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 606, 115-120

Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S (2003): Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 93, 421-428

Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G (1993): Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87, 755-763

Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM (1999): Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 38, 10361-10370

Gloerich M, Bos JL (2010): Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 355-375

Goppelt-Struebe M, Hahn A, Iwanciw D, Rehm M, Banas B (2001): Regulation of connective tissue growth factor (ccn2, ctgf) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *J Clin Pathol: Mol Pathol* 54, 176-179

Grandoch M, Roscioni SS, Schmidt M (2010): The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br J Pharmacol* 159, 265-284

Granneman JG (2001): The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E199-202

Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999): Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435-447

Gstraunthaler G (2003): Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX* 20, 275-281

Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M, Sabbah HN (1996): Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol Circ Physiol* 270, 1159-1164

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008): Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321

Gustafsson AB, Brunton LL (2000): beta-adrenergic stimulation of rat cardiac fibroblasts enhances induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta via message stabilization. *Mol Pharmacol* 58, 1470-1478

Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ (1995): Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol* 25, 1154-1161

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

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J (2003): Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107, 984-991

Hemmings HC, Jr., Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984 a): DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503-505

Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Aswad DW, Greengard P (1984 b): DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. II. Purification and characterization of the phosphoprotein from bovine caudate nucleus. *J Neurosci* 4, 99-110

Herzig S, Neumann J (2000): Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80, 173-210

Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Kaumann AJ (2002): Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. *Br J Pharmacol* 136, 217-229

Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M (2001): Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 12, 1853-1861

Hinz B (2007): Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127, 526-537

Hinz B, Gabbiani G (2003 a): Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 90, 993-1002

Hinz B, Gabbiani G (2003 b): Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 14, 538-546

Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001 a): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12, 2730-2741

Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G (2001 b): Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159, 1009-1020

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G (2007): The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170, 1807-1816

Hirai DM, Copp SW, Ferguson SK, Holdsworth CT, Musch TI, Poole DC (2013): The NO donor sodium nitroprusside: evaluation of skeletal muscle vascular and metabolic dysfunction. *Microvasc Res* 85, 104-111

Holmes JW, Borg TK, Covell JW (2005): Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng* 7, 223-253

- Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005): Leitlinie zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 94, 488-509
- Hu H, Sachs F (1997): Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1511-1523
- Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M (2008): Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 482-489
- Huchon D, Ozon R, Demaille JG (1981): Protein phosphatase-1 is involved in *Xenopus* oocyte maturation. *Nature* 294, 358-359
- Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC (2012 a): Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 277-287
- Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, Snead A, Lu D, Aroonsakool N (2012 b): cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol* 166, 447-456
- Iyer RB, Koritz SB, Kirchberger MA (1988): A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 55, 1-6
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS (1999): The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283, 83-87
- Kalluri R, Zeisberg M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401
- Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Gunther J, Theres H, Scholz H (2003): Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol* 82, 111-120
- Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC (1991): Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 148, 157-173
- Kang M, Chung KY, Walker JW (2007): G-protein coupled receptor signaling in myocardium: not for the faint of heart. *Physiology (Bethesda)* 22, 174-184

Kataoka C, Egashira K, Inoue S, Takemoto M, Ni W, Koyanagi M, Kitamoto S, Usui M, Kaibuchi K, Shimokawa H (2002): Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 39, 245-250

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998): A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275-2279

Kennedy L, Liu S, Shi-Wen X, Chen Y, Eastwood M, Sabetkar M, Carter DE, Lyons KM, Black CM, Abraham DJ (2007): CCN2 is necessary for the function of mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 313, 952-964

Keshet Y, Seger R (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661, 3-38

Kiemer AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM (2002): Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res* 90, 874-881

Kim SS, Wen W, Prowse P, Hamilton DW (2015): Regulation of matrix remodelling phenotype in gingival fibroblasts by substratum topography. *J Cell Mol Med* 19, 1183-1196

Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE (1993): Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* 91, 907-914

Kohl P, Kamkin AG, Kiseleva IS, Streubel T (1992): Mechanosensitive cells in the atrium of frog heart. *Exp Physiol* 77, 213-216

Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, Rockman HA (2001): Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* 104, 2485-2491

Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014): The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 71, 549-574

Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J (2000): The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* 5, 271-280

- Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH (2000): Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86, 51-58
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lal H, Ahmad F, Zhou J, Yu JE, Vagnozzi RJ, Guo Y, Yu D, Tsai EJ, Woodgett J, Gao E (2014): Cardiac fibroblast glycogen synthase kinase-3beta regulates ventricular remodeling and dysfunction in ischemic heart. *Circulation* 130, 419-430
- Law BA, Levick SP, Carver WE (2012): Alterations in cardiac structure and function in a murine model of chronic alcohol consumption. *Microsc Microanal* 18, 453-461
- Lazarides E (1975): Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 65, 549-561
- Lazarides E, Burridge K (1975): Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* 6, 289-298
- Leask A (2008): Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal* 20, 1409-1414
- Leask A (2010): Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 106, 1675-1680
- Lehmann GM, Xi X, Kulkarni AA, Olsen KC, Pollock SJ, Baglole CJ, Gupta S, Casey AE, Huxlin KR, Sime PJ (2011): The aryl hydrocarbon receptor ligand ITE inhibits TGFbeta1-induced human myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 178, 1556-1567
- Leslie KO, Taatjes DJ, Schwarz J, vonTurkovich M, Low RB (1991): Cardiac myofibroblasts express alpha smooth muscle actin during right ventricular pressure overload in the rabbit. *Am J Pathol* 139, 207-216
- Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF (2008): Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res* 102, 185-192
- Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, Diwan A, Martini JS, Sparks L, Parekh RR (2008): A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med* 14, 510-517

Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Schulze K, Schultheiss HP, Tschöpe C, Westermann D (2012): Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int* 2012, 875742

Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, Goshorn DK, Sheats NJ, Bruce JA, Mains IM, Hendrick JK, Hewett KW, Gourdie RG (2006): Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction. *Circulation* 113, 2919-2928

Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG (2000): ABC of heart failure: aetiology. *BMJ* 320, 104-107

Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S (2012): CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S24

Liu X, Ostrom RS, Insel PA (2004): cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1089-1099

Liu X, Sun SQ, Hassid A, Ostrom RS (2006): cAMP inhibits transforming growth factor-beta-stimulated collagen synthesis via inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad signaling in cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 70, 1992-2003

Liu X, Thangavel M, Sun SQ, Kaminsky J, Mahautmr P, Stitham J, Hwa J, Ostrom RS (2008): Adenylyl cyclase type 6 overexpression selectively enhances beta-adrenergic and prostacyclin receptor-mediated inhibition of cardiac fibroblast function because of colocalization in lipid rafts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 359-369

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265, 3202-3211

Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992): Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267, 8558-8564

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

- Long CS (2001): The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6, 81-94
- Lopez B, Gonzalez A, Diez J (2010): Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 121, 1645-1654
- Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld J, Tsvetkova T, Robertson AD (2002): Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 346, 1357-1365
- Lu D, Aroonsakool N, Yokoyama U, Patel HH, Insel PA (2013): Increase in cellular cyclic AMP concentrations reverses the profibrogenic phenotype of cardiac myofibroblasts: a novel therapeutic approach for cardiac fibrosis. *Mol Pharmacol* 84, 787-793
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994): Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75, 401-409
- Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ (2013): Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113, 739-753
- Ma Y, de Castro Bras LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, Lange RA, Tyagi SC, Lindsey ML (2014): Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch* 466, 1113-1127
- MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ, Cohen P (1989): Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1010, 218-226
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991): Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196, 725-734
- MacLennan DH, Kranias EG (2003): Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 566-577
- Mahmood T, Yang PC (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429-434
- Manabe I, Shindo T, Nagai R (2002): Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91, 1103-1113

- Mann DL, Bristow MR (2005): Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 111, 2837-2849
- Mansuy IM, Shenolikar S (2006): Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci* 29, 679-686
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000): PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376
- Maurer AM: Expression des cardiac ankyrin repeat protein (CARP) in der humanen Herzinsuffizienz. Med. Diss. Hamburg 2009
- McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602
- Medugorac I, Jacob R (1983): Characterisation of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovasc Res* 17, 15-21
- Meran S, Steadman R (2011): Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 92, 158-167
- MERIT-HF-Studie (1999): Effect of metoprolol CR/XL in chronich heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353(9169), 2001-2007
- Messer AE, Jacques AM, Marston SB (2007): Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42, 247-259
- Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JA (2011): Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 57, 891-903
- Miller CL, Cai Y, Oikawa M, Thomas T, Dostmann WR, Zaccolo M, Fujiwara K, Yan C (2011): Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res Cardiol* 106, 1023-1039
- Mitrovic V, Jovanovic A, Lehinant S (2011): Soluble guanylate cyclase modulators in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 8, 38-44

Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K (1999): Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181, 153-159

Movsesian MA, Bristow MR (2005): Alterations in cAMP-mediated signaling and their role in the pathophysiology of dilated cardiomyopathy. *Curr Top Dev Biol* 68, 25-48

Mudd JO, Kass DA (2007): Reversing chronic remodeling in heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 5, 585-598

Mudd JO, Kass DA (2008): Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928

Mullis KB (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 56-61, 64-55

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273

Nag AC (1980): Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28, 41-61

Nakielny S, Campbell DG, Cohen P (1991): The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem* 199, 713-722

Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz - Langfassung, 2. Auflage. Version 2. 2017.

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991): Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circulation Research* 69, 1450-1457

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997): Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29, 265-272

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004): Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94, 1543-1553

Nimmo GA, Cohen P (1978): The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 87, 341-351

O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, Adams KF, Jr., McNulty SE, Grossman SH, McKenna WJ, Zannad F, Swedberg K, Gheorghiade M (1999): Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J* 138, 78-86

Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, Misono KS (2004): Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* 279, 28625-28631

Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R (2014): Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest* 124, 2785-2801

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S (1997): Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-1141

Ongstad EL, Gourdie RG (2012): Myocyte-fibroblast electrical coupling: the basis of a stable relationship? *Cardiovasc Res* 93, 215-217

Packer M (2001): Current role of beta-adrenergic blockers in the management of chronic heart failure. *Am J Med* 110 Suppl 7A, 81S-94S

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183

Pellegrin S, Mellor H (2007): Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120, 3491-3499

Peterson RT, Schreiber SL (1998): Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr Biol* 8, R248-250

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18, 891-975

Ponticos M (2013): Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascul Pharmacol* 58, 189-193

Port JD, Bristow MR (2001): beta-Adrenergic receptors, transgenic mice, and pharmacological model systems. *Mol Pharmacol* 60, 629-631

Potter LR (2005): Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci* 10, 1205-1220

Potts JD, Runyan RB (1989): Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor beta. *Dev Biol* 134, 392-401

Raizman JE, Komljenovic J, Chang R, Deng C, Bedosky KM, Rattan SG, Cunningham RH, Freed DH, Dixon IM (2007): The participation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in primary cardiac myofibroblast migration, contraction, and proliferation. *J Cell Physiol* 213, 540-551

Rapundalo ST (1998): Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38, 559-588

Redondo J, Bishop JE, Wilkins MR (1998): Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol* 124, 1455-1462

Remme WJ, Riegger G, Hildebrandt P, Komajda M, Jaarsma W, Bobbio M, Soler-Soler J, Scherhag A, Lutiger B, Ryden L (2004): The benefits of early combination treatment of carvedilol and an ACE-inhibitor in mild heart failure and left ventricular systolic dysfunction. The carvedilol and ACE-inhibitor remodelling mild heart failure evaluation trial (CARMEN). *Cardiovasc Drugs Ther* 18, 57-66

Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002): Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415, 206-212

Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR, Kranias EG (2006): Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem* 281, 38599-38608

Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG (2007): Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H762-769

Rohr S (2009): Myofibroblasts in diseased hearts: new players in cardiac arrhythmias? *Heart Rhythm* 6, 848-856

Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M (2008): Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 345-357

Ruwhof C, van Wamel AE, Egas JM, van der Laarse A (2000): Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 208, 89-98

Sabbah HN, Goldstein S (1993): Ventricular remodelling: consequences and therapy. *Eur Heart J* 14 Suppl C, 24-29

Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molкетин JD, Nairn AC, Bibb JA (2006): Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem* 281, 24322-24335

Santiago JJ, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, Bedosky KM, Freed DH, Kardami E, Dixon IM (2010): Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn* 239, 1573-1584

Satwani S, Dec GW, Narula J (2004): Beta-adrenergic blockers in heart failure: review of mechanisms of action and clinical outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 9, 243-255

Schaper J, Speiser B (1992): The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 1, 303-309

Schiller M, Dennler S, Anderegg U, Kokot A, Simon JC, Luger TA, Mauviel A, Bohm M (2010): Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-beta/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. *J Biol Chem* 285, 409-421

Schinner E, Wetzl V, Schlossmann J (2015): Cyclic nucleotide signalling in kidney fibrosis. *Int J Mol Sci* 16, 2320-2351

Schirger JA, Grantham JA, Kullo IJ, Jougasaki M, Wennberg PW, Chen HH, Lisy O, Miller V, Simari RD, Burnett JC, Jr. (2000): Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol* 35, 796-801

Scholz P: Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes. Med. Diss. Berlin 2009

Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998): Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 969-976

Schroder M, Kaufman RJ (2005): The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789

Scrimgeour AG, Allen PB, Fienberg AA, Greengard P, Lawrence JC, Jr. (1999): Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 274, 20949-20952

Selige J, Tenor H, Hatzelmann A, Dunkern T (2010): Cytokine-dependent balance of mitogenic effects in primary human lung fibroblasts related to cyclic AMP signaling and phosphodiesterase 4 inhibition. *J Cell Physiol* 223, 317-326

Serini G, Gabbiani G (1999): Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250, 273-283

Shah KB, Inoue Y, Mehra MR (2006): Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med* 166, 1805-1813

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820

Sharov VG, Kostin S, Todor A, Schaper J, Sabbah HN (2005): Expression of cytoskeletal, linkage and extracellular proteins in failing dog myocardium. *Heart Fail Rev* 10, 297-303

Shearer F, Lang CC, Struthers AD (2013): Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in heart failure. *Clin Pharmacol Ther* 94, 459-467

Shi-Wen X, Rodriguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, du Bois RM, Denton CP, Black CM (2006 a): Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. *Mol Cell Biol* 26, 5518-5527

Shi-Wen X, Stanton LA, Kennedy L, Pala D, Chen Y, Howat SL, Renzoni EA, Carter DE, Bou-Gharios G, Stratton RJ (2006 b): CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 281, 10715-10726

Simmerman HK, Jones LR (1998): Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78, 921-947

SOLVD-Studie (1991): SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN (1991): Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 325(5), 293-302

- SOLVD-Studie (1992): SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB Jr, Cohn JN (1992): Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med* 327(24), 1768
- Souders CA, Bowers SL, Baudino TA (2009): Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105, 1164-1176
- Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2018 a): Die zehn häufigsten Todesursachen: Sterbefälle nach der ICD-10 im Jahr 2015
- Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (2018 b): Krankheitskosten in Deutschland nach Krankheitsdiagnosen (ICD-10) im Jahr 2015
- Strieter RM, Keeley EC, Burdick MD, Mehrad B (2009): The role of circulating mesenchymal progenitor cells, fibrocytes, in promoting pulmonary fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120, 49-59
- Sulakhe PV, Vo XT (1995): Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* 149-150, 103-126
- Sun Y, Weber KT (2000): Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 46, 250-256
- Sun Y, Weber KT (2003): RAS and connective tissue in the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 919-931
- Sutton MG, Sharpe N (2000): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101, 2981-2988
- Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA (2005): Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 437-442
- Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M (2000): Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4239-4244
- Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT (1991): Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 69, 1185-1195
- Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C (1986): Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J* 55, 575-581

Tao ZY, Cavasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP (2004): Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci* 74, 1561-1572

Tavernier G, Galitzky J, Bousquet-Melou A, Montastruc JL, Berlan M (1992): The positive chronotropic effect induced by BRL 37344 and CGP 12177, two beta-3 adrenergic agonists, does not involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 1083-1090

Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P (1996): Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 97, 2891-2897

Temin HM, Mizutani S (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213

Togo S, Liu X, Wang X, Sugiura H, Kamio K, Kawasaki S, Kobayashi T, Ertl RF, Ahn Y, Holz O (2009): PDE4 inhibitors roflumilast and rolipram augment PGE2 inhibition of TGF- β 1-stimulated fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L959-969

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993): Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454-463

van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, van der Laarse A (2001): The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 218, 113-124

Vasquez C, Benamer N, Morley GE (2011): The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 57, 380-388

Vatner SF, Vatner DE, Homcy CJ (2000): beta-adrenergic receptor signaling: an acute compensatory adjustment-inappropriate for the chronic stress of heart failure? Insights from G α overexpression and other genetically engineered animal models. *Circ Res* 86, 502-506

- Vettel C, Lammle S, Ewens S, Cervirgen C, Emons J, Ongherth A, Dewenter M, Lindner D, Westermann D, Nikolaev VO (2014): PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H1246-1252
- Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH (1993): Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 88, 2849-2861
- Visconti RP, Markwald RR (2006): Recruitment of new cells into the postnatal heart: potential modification of phenotype by periostin. *Ann N Y Acad Sci* 1080, 19-33
- Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F (1991): Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 12, 488-494
- Volarevic S, Thomas G (2001): Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65, 101-127
- Walker DH, DePaoli-Roach AA, Maller JL (1992): Multiple roles for protein phosphatase 1 in regulating the *Xenopus* early embryonic cell cycle. *Mol Biol Cell* 3, 687-698
- Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA (2003): Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1871-1881
- Wang J, Zohar R, McCulloch CA (2006): Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* 312, 205-214
- Wang K, Ash JF, Singer SJ (1975): Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4483-4486
- Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4412
- Weber K, Groeschel-Stewart U (1974): Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4561-4564
- Weber KT (1989): Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13, 1637-1652

Weber KT (1997): Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96, 4065-4082

Weber KT (2004): Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 22, 47-50

Weber KT, Brilla CG (1991): Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83, 1849-1865

Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW (1990): Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 82, 1387-1401

Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Guarda E, Zhou G, Sriram K (1993): Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone. *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 1, 107-124

Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH (1993): Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268, 16852-16858

Whitcomb DC, Lowe ME (2007): Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci* 52, 1-17

White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ (1987): Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 76, 44-51

Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ (1994): The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 145, 868-875

Williams KR, Hemmings HC, Jr., LoPresti MB, Konigsberg WH, Greengard P (1986): DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein. Primary structure and homology with protein phosphatase inhibitor-1. *J Biol Chem* 261, 1890-1903

Wittköpper K: Generierung und kardiale Phänotypisierung von Mäusen, die phospho-mutierte Formen des Phosphatase-Inhibitor-1 herzspezifisch und konditional überexprimieren. Med. Diss. Hamburg 2009

Wittkopper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A (2011): Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological beta-adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res* 91, 392-401

- Woo AY, Xiao RP (2012): beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin* 33, 335-341
- Xiang Y, Kobilka BK (2003): Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 300, 1530-1532
- Xiao RP, Ji X, Lakatta EG (1995): Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47, 322-329
- Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY (2009): Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension* 54, 877-884
- Yokoyama T, Sekiguchi K, Tanaka T, Tomaru K, Arai M, Suzuki T, Nagai R (1999): Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 276, H1968-1976
- Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA (2008): The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6386-6391
- Zak R (1974): Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 35, suppl II:17-26
- Zambon AC, Zhang L, Minovitsky S, Kanter JR, Prabhakar S, Salomonis N, Vranizan K, Dubchak I, Conklin BR, Insel PA (2005): Gene expression patterns define key transcriptional events in cell-cycle regulation by cAMP and protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8561-8566
- Zannad F, Dousset B, Alla F (2001): Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension* 38, 1227-1232
- Zarate YA, Hopkin RJ (2008): Fabry's disease. *Lancet* 372, 1427-1435
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB (2007): Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-961
- Zhang L, Yun H, Murray F, Lu R, Wang L, Hook V, Insel PA (2011): Cytotoxic T lymphocyte antigen-2 alpha induces apoptosis of murine T-lymphoma cells and cardiac fibroblasts and is regulated by cAMP/PKA. *Cell Signal* 23, 1611-1616

Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM (1994): The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 166-173

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ali El-Armouche für die Vergabe des Forschungsthemas, die Aufnahme in seine Forschungsgruppe und seine ständige Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für das kollegiale Miteinander und auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann danke ich herzlich dafür, dass ich in dem von ihm geleiteten Institut wissenschaftlich arbeiten durfte und für seine vielen hilfreichen Anregungen im Rahmen der Laborbesprechungen.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz danke ich herzlich für ihre stetigen Hilfestellungen, vor allem in Bezug auf die Forschung an Fibroblasten.

Ich möchte mich insbesondere bei Frau Dr. rer. nat. Christiane Vettel für ihre exzellente Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit von Herzen bedanken. Ihre unentwegte persönliche Unterstützung, ihre unzähligen Anregungen und ihre konstruktiven Ideen, auch nach dem Wechsel nach Mannheim, werde ich nie vergessen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Katrin Wittköpper für ihre Betreuung bis zu ihrem Wechsel nach Ulm bedanken sowie bei Herrn Julius Emons für die Einführung in und Hilfe bei der Laborarbeit. Dr. rer. nat. Simon Lämmle danke ich herzlich für das gemeinsame Arbeiten an den Versuchen zum β -AR-Subtypen und zur Überprüfung der Zellkulturbedingungen. Frau Dr. rer. nat. Christina Würtz möchte ich herzlich Danke sagen für ihre Hilfestellungen im Umgang mit Fibroblasten. Bei Herrn Dr. med. Malte Tiburcy und Herrn Dr. James Hudson bedanke ich mich herzlich für ihre hilfreiche Einführung in die Durchflusszytometrie, wobei ich James ebenfalls dafür danken möchte, dass er uns im Rahmen eines Laborausfluges das australische Cricket näher gebracht hat. Herzlichen Dank an alle technischen Assistentinnen und Assistenten für die hervorragende Zusammenarbeit.

Meinen Laborkollegen Alex Markov, Amandine Godier-Furnémont, Ceyhun Cervigen, Dr. med. Danilo Seppelt, Günther Engel, Julius Emons, Krasimira Sharkova, Kristian Otte, Dr. rer. nat. Poh Loong Soong, Sonka-Johanna Sanders, Stefanie Meyer-Roxlau, Dr. rer. nat. Svenja Hartmann und Dr. rer. nat. Sumon Sur danke ich herzlich für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die wundervolle gemeinsame Zeit im Labor, die ich niemals missen möchte!