

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

(Prof. Dr. med. W.-H.. Zimmermann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Analyse des antifibrotischen Potenzials der  $\beta$ -adrenergen  
Signalkaskade und des PKA-Effektors Protein-Phosphatase-Inhibitor-1  
in kardialen Fibroblasten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ceyhun Cevirgen

aus

Bad Oeynhausen

Göttingen 2017

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

**Prüfungskommission**

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

Koreferentin: Prof. Dr. med. Elisabeth Zeisberg

Promotor: Prof. Dr. med. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 27.06.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Analyse des antifibrotischen Potenzials der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade und des PKA-Effektors Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 in kardialen Fibroblasten“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(*Unterschrift*)

## I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis .....	I
II. Abbildungsverzeichnis .....	IV
III. Tabellenverzeichnis .....	V
IV. Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1. Zusammenfassung .....	1
2. Summary .....	3
3. Einleitung.....	5
3.1 Herzinsuffizienz .....	5
3.1.1 Allgemeines .....	5
3.1.2 Klinik der Herzinsuffizienz .....	6
3.2 Kardiale Sympathikusaktivierung: $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten .....	9
3.2.1 $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion unter physiologischen Bedingungen .....	9
3.2.2 Veränderungen der $\beta$ -adrenergen Kaskade in der Herzinsuffizienz.....	12
3.3 $\beta$ -adrenerge Signalverstärkung: Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 in Kardiomyozyten .....	13
3.4 Kardiale Fibroblasten .....	16
3.4.1 Allgemeines .....	17
3.4.2 Kardiale Fibrose .....	18
3.4.3 Die Rolle der cAMP- und cGMP-abhängigen Signaltransduktion in Fibrosehemmung.....	22
3.4.4 $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Fibroblasten.....	25
3.5 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (FACS, <i>Fluorescence Activated         Cell Sorting</i> ) .....	26
3.6 Zielsetzung.....	27
4. Material und Methoden.....	28
4.1 Material .....	28

## I. Inhaltsverzeichnis

---

4.1.1 Tiere.....	28
4.1.2 Antikörper.....	29
4.1.3 Geräte.....	31
4.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	33
4.1.5 Feinchemikalien und Zellkultursubstanzen.....	34
4.1.6 Puffer, Nährmedien und Lösungen.....	36
4.1.7 Adenoviren.....	40
4.1.8 Verwendete Software.....	42
4.1.9 Statistische Auswertung.....	42
4.2 Präparation und Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten.....	42
4.2.1 Gewinnung von neonatalen Rattenkardiomyozten und Fibroblasten.....	42
4.2.2 Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten.....	44
4.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	46
4.3 Pharmakologische Intervention.....	47
4.4 Adenovirale Transduktion der Fibroblasten.....	47
4.5 cAMP-Konzentrationsbestimmung in kardialen Fibroblasten.....	49
4.6 Durchflusszytometrie.....	50
4.6.1 Vorbereitung der Fibroblasten für die Durchflusszytometrie (FACS).....	50
4.6.2 Messung und Auswertung der Proben.....	51
4.7 Kultivierung und Färbung der Fibroblasten für die Immunfluoreszenz.....	52
4.8 Proteinbiochemische Methoden.....	53
4.8.1 Proteingewinnung aus Zellen.....	53
4.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	54
4.8.3 Vorbereitung der Proteinlösungen für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
4.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
4.8.5 Immunoblot und Immunodetektion.....	55
5. Ergebnisse.....	57
5.1 Etablierung.....	58
5.1.1 Bestimmung des Reinheitsgrades der Fibroblastenkulturen.....	58
5.1.2 Normalisierung auf die Ponceau S-Proteinfärbung.....	60
5.1.3 Analyse der $\beta$ -adrenergen Rezeptorverteilung auf Fibroblasten.....	62

## I. Inhaltsverzeichnis

---

5.2 Analyse einer chronischen $\beta$ -adrenergen Rezeptorstimulation in NRCF.....	64
5.2.1 Analyse des cAMP-Gehalts in der Zelle.....	64
5.2.2 Vergleich der CREB-Phosphorylierung nach akuter und chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	66
5.2.3 Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	68
5.2.4 Untersuchung von $\alpha$ -SMA in der Durchflusszytometrie.....	70
5.2.5 Immunhistochemische Aufnahmen von $\alpha$ -SMA.....	72
5.2.6 Untersuchung der CTGF-Expression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	75
5.2.7 Immunhistochemische Visualisierung von CTGF.....	77
5.2.8 Ermittlung der Proteinkonzentration.....	79
5.3 Rolle des Inhibitor-1 in NRCF.....	80
5.3.1 Nachweis einer erfolgreichen Überexpression.....	80
5.3.2 Untersuchung der CREB-Phosphorylierung nach Überexpression von Inhibitor-1.....	85
5.3.3 Untersuchung von $\alpha$ -SMA nach Überexpression des Inhibitor-1.....	88
5.3.4 Untersuchung der intrazellulären CTGF-Spiegel nach Überexpression des Inhibitor-1.....	89
5.4 Auswirkungen der adenoviralen Transduktion und der eGFP-Expression auf die CTGF-Synthese.....	92
6. Diskussion.....	94
6.1 Zellkulturbedingte Fibroblastentransformation.....	95
6.2 $\beta_2$ -Rezeptor in Fibroblasten.....	97
6.3 $\beta$ -adrenerge Desensitivierung in Fibroblasten.....	98
6.4 Antifibrotische Effekte von cAMP.....	101
6.4.1 Rezeptorvermittelte und -unabhängige Möglichkeiten zur Erhöhung des cAMP-Spiegels.....	101
6.4.2 Herunterregulation von CTGF.....	103
6.4.3 Auswirkung von cAMP auf die Expression von $\alpha$ -SMA.....	105
6.4.4 Potenzielle Auswirkung von cAMP auf die Gesamtproteinmenge.....	108
6.5 Die Rolle des Inhibitor-1 in NRCF.....	109
7. Literaturverzeichnis.....	115

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> <i>Circulus vitiosus</i> der dekompensierten Herzinsuffizienz .....	8
<b>Abbildung 2:</b> Regulationsmechanismen des Inhibitor-1 .....	16
<b>Abbildung 3:</b> Profibrotische und antifibrotische Faktoren.....	25
<b>Abbildung 4:</b> Immunoblot zum Reinheitsnachweis der Kulturen .....	59
<b>Abbildung 5:</b> Ponceau S-Aufnahme als Ladekontrolle.....	61
<b>Abbildung 6:</b> Die $\beta_2$ -AR-induzierte Phosphorylierung von Inhibitor-1.....	63
<b>Abbildung 7:</b> cAMP-Spiegel nach akuter und chronischer $\beta$ -AR-Stimulation.....	65
<b>Abbildung 8:</b> p-CREB nach akuter und chronischer $\beta$ -AR-Stimulation. ....	67
<b>Abbildung 9:</b> $\alpha$ -SMA im Immunoblot nach chronischer $\beta$ -AR-Stimulation.....	70
<b>Abbildung 10:</b> FACS-Analyse von $\alpha$ -SMA nach chronischer $\beta$ -AR-Stimulation .....	72
<b>Abbildung 11:</b> Inverse Fluoreszenzmikroskopie von $\alpha$ -SMA.....	75
<b>Abbildung 12:</b> CTGF im Immunoblot nach chronischer $\beta$ -AR-Stimulation. ....	76
<b>Abbildung 13:</b> Inverse Fluoreszenzmikroskopie von CTGF .....	78
<b>Abbildung 14:</b> Proteinkonzentration nach chronischer $\beta$ -AR-Stimulation.....	79
<b>Abbildung 15:</b> Fluoreszenzmikroskopie nach adenoviraler Transduktion .....	82
<b>Abbildung 16:</b> Immunoblot einer erfolgreichen adenoviralen Transduktion .....	84
<b>Abbildung 17:</b> p-CREB in I-1S67A-überexprimierenden Zellen .....	87
<b>Abbildung 18:</b> $\alpha$ -SMA in I-1S67A-überexprimierenden Zellen .....	89
<b>Abbildung 19:</b> CTGF nach Überexpression des I-1S67A.....	91
<b>Abbildung 20:</b> Auswirkungen der adenoviralen Transdukton auf CTGF .....	93

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Primärantikörper Western Blot .....	29
<b>Tabelle 2:</b> Sekundärantikörper Western Blot .....	30
<b>Tabelle 3:</b> Primärantikörper Durchflusszytometrie .....	30
<b>Tabelle 4:</b> Primärantikörper Immunfluoreszenz .....	31
<b>Tabelle 5:</b> Zellkuturschalen .....	46



## IV. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AC	Adenylylcyclase
ACE	engl.: <i>angiotensin converting enzyme</i> dt.: Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ad	Adenovirus
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Adrenorezeptor
ARK	Adrenorezeptor-Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> dt.: Rinderserumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kationen
cAMP	zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
CBFHH	engl.: <i>Calcium and Bicarbonate free Hanks with HEPES</i> dt.: Kalzium- und Bikarbonat-frei HEPES-gepufferte Hanks balancierte Salzlösung
CF	engl.: <i>cardiac fibroblasts</i> dt.: kardiale Fibroblasten
CGP	CGP 20712 $\beta_1$ -selektiver Adrenorezeptor-Blocker
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRE	cAMP Responselement
CREB	cAMP Responselement-Bindeprotein
CTGF	engl. <i>connective tissue growth factor</i> dt.: Bindegewebewachstumsfaktor
DAPI	Diamidino-2-phenylindole
DARPP	cAMP-reguliertes Phosphoprotein
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

---

DNA	engl.: <i>Deoxyribonucleic acid</i> dt.: Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	engl.: <i>Enhanced chemiluminescence</i> dt.: verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i> dt.: verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EGTA	engl.: <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> dt.: Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
Epac	engl.: <i>exchange proteins directly activated by cAMP</i> dt.: Austauscherproteine aktiviert durch cAMP
ERK	engl.: <i>extracellular signal-regulated kinase</i> dt.: Extrazellular-Signal-regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> dt.: Durchflusszytometrie
FCS	engl.: <i>foetal calf serum</i> dt.: fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCN	engl.: <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated</i> dt.: Hyperpolarisationsaktivierte Nukleotid-verstärkte Kationenkanäle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

---

HFF	engl.: <i>human foreskin fibroblasts</i> dt.: humane Vorhautfibroblasten
HRPO	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> dt.: Meerrettich-Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICI	ICI 118551 $\beta_2$ -selektiver Adrenozeptor-Blocker
ISO	Isoprenalin
K <sup>+</sup>	Kalium-Kation
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kardiomyozyten
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Kation
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> dt.: Boten-RNA
MOI	engl.: <i>multiplicity of infection</i> dt.: Multiplizität der Infektion
n	Grundgesamtheit
Na <sup>+</sup>	Natrium-Kation
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NI	engl.: <i>no intervention</i>
NIH	engl.: National Institutes of Health
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium
nM	Nanomol
NO	engl.: <i>nitrogen oxide</i>

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

---

	dt.: Stickstoffmonoxid
NRCF	engl.: <i>neonatal rat cardiac fibroblasts</i>
	dt.: kardiale Fibroblasten aus neonatalen Ratten
NRK	engl.: <i>normal rat kidney</i>
	dt.: normale Rattenniere
NYHA	engl.: New York Heart Association
P	Passage
p	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
	dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	engl.: <i>platelet derived growth factor</i>
	dt.: Blutplättchen-Wachstumsfaktor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phopholamban
PP	Proteinphosphatase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA	Radio-Immunopräzipitation Assay
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SEM	engl.: <i>Standard Error of the Mean</i>
	dt.: Standardfehler des Mittelwertes
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
	dt.: Natrium-Dodecylsulfat
SERCA	engl.: <i>Sarcoplasmic-/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase</i>
	dt.: Sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
SMA	engl.: <i>smooth muscle actin</i>

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

---

	dt.: Glattmuskelaktin
SMAD	engl.: <i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
T	Threonin
TBS-T	engl.: <i>Tris-buffered saline-Tween</i> dt.: Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta_1$	engl.: <i>transforming growth factor beta 1</i> dt.: transformierender Wachstumsfaktor beta 1
ü. N.	über Nacht
$\mu$ l	Mikroliter
Vim	Vimentin
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
ZTE	Zentrale Tiereinheit

### 1. Zusammenfassung

Der fibrotische Umbau des Herzmuskels kommt bei einer Reihe von Herzerkrankungen zum Vorschein. Eine tragende Rolle für diese Entwicklung spielen die bindegewebsproduzierenden Fibroblasten des Herzens. Im Zusammenspiel mit den Kardiomyozyten sind sie für die kardiale Funktionalität von großer Bedeutung. Unter pathologischen Bedingungen differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten, die sich u.a. durch eine erhöhte Produktion extrazellulärer Matrixproteine, der Sekretion profibrotischer Faktoren und der Expression von Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA) auszeichnen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Gewebsfibrotisierung und rücken daher zunehmend in den Fokus aktueller Forschungen. cAMP wird mit einer Inhibierung der Fibroblasten-Transformation in Verbindung gebracht. Im Zentrum dieser Arbeit stehen daher die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade und ihr potenzieller Einfluss auf den fibrotischen Umbau. Anders als in Kardiomyozyten wird in Fibroblasten die PKA-abhängige Phosphorylierung von Phosphoproteinen hauptsächlich durch den  $\beta_2$ -Rezeptorsubtyp vermittelt, wohingegen der  $\beta_1$ -Rezeptor in diesem Zusammenhang nicht in Erscheinung tritt. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung eine chronische  $\beta_2$ -Rezeptorstimulation auf die Expression profibrotischer Faktoren in kultivierten Fibroblasten aus neonatalen Rattenherzen hat. Auf diese Weise wurde ein Zustand simuliert, der einer Herzinsuffizienz mit erhöhten Katecholaminspiegeln nahekommt. Durch diese Intervention konnte eine deutliche Reduktion des Fibrose-assoziierten sekretorischen Faktors CTGF erreicht werden, während die Expression von  $\alpha$ -SMA unverändert blieb. Von einer vollständigen Rekonversion zu ruhenden Fibroblasten war unter Berücksichtigung der konstanten  $\alpha$ -SMA-Spiegel nicht auszugehen. Die Herunterregulation von CTGF ist eine Folge der erhöhten cAMP-Spiegel nach  $\beta$ -adrenerger Simulation. Der Botenstoff cAMP besitzt ein antifibrotisches Potenzial. In einem cAMP-Assay konnte gezeigt werden, dass durch die Isoprenalingabe ein cAMP-Anstieg erreicht wurde. Als Begleiterscheinung trat im Rahmen der chronischen Stimulation das Phänomen der  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung auf, welche durch Analyse des Phosphoproteins p-CREB und des sinkenden cAMP-Spiegels nachvollzogen werden konnte. Im Folgenden stellte sich die Frage, ob durch Verstärkung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs eine zusätzliche antifibrotische Wirkung eintritt. Als Verstärkerelement diente dazu der

Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1). In den Überexpressionsversuchen konnte zunächst eine Zunahme des PKA-abhängigen Phosphorylierungsniveaus in Gegenwart des I-1 demonstriert werden. Eine antifibrotische Wirkungssteigerung ließ sich allerdings durch diese Maßnahme nicht herbeiführen.

Durch Modulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade und damit der cAMP-Homöostase kann bis zu einem gewissen Ausmaß also in die Regulation von profibrotischen Faktoren eingegriffen werden. Es bleibt jedoch abzuwarten inwieweit sich dieses Konzept auf das lebende Herz übertragen lässt. *In vivo* stellt sich die Situation viel komplexer dar, da Fibroblasten immer in Interaktion mit den Kardiomyozyten treten.

## 2. Summary

The fibrotic remodeling of the heart appears in several cardiac diseases. Especially fibroblasts, which are known as the tissue producing cells in the heart, contribute to this process. Interacting with cardiomyocytes they play an important role for the cardiac functionality. Under pathological conditions fibroblasts differentiate to myofibroblasts, which are characterized by an increased production of extracellular matrix, secretion of profibrotic markers and the expression of smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). They play an important role in tissue fibrosis and hence they receive more and more attention in research. cAMP is associated with an inhibition of fibroblast transformation. Central aspects of this work are the  $\beta$ -adrenic receptor pathway and its potential impact on fibrotic remodeling. In contrast to cardiomyocytes PKA-dependend phosphorylation in fibroblasts is mainly mediated by the  $\beta_2$ -receptor subtype. The  $\beta_1$ -receptor does not seem to be involved in this mechanism. In this work the effects of chronic  $\beta_2$ -receptor stimulation on the expression of profibrotic markers in cultured fibroblasts from neonatal rat heart were closer analysed. This set-up was meant to simulate the conditions in chronic heart failure, when catecholamine levels reach a maximum. Through this intervention the expression of the fibrosis associated secretory marker CTGF was significantly reduced, whereas  $\alpha$ -SMA levels remained constant. Considering the constant  $\alpha$ -SMA levels a reconversion to fibroblasts did not take place. The downregulation of CTGF is a result of increasing cAMP-levels induced by  $\beta$ -adrenic stimulation. It is known, that the second messenger cAMP has antifibrotic potential. In cAMP-assays we could demonstrate an increase of cAMP-levels after application of isoprenaline. A side effect of the chronic stimulation is the phenomenon of  $\beta$ -adrenic desensitization, which could be seen in the phosphorylation of CREB and the decreasing cAMP-levels. Another question, which resulted from the findings, was whether a boost of the  $\beta$ -adrenic pathway induces an additional antifibrotic effect. For this purpose inhibitor-1 (I-1), a well known amplifier of the pathway, was used by infecting fibroblasts with Ad-I-1. By overexpressing I-1 an increase of PKA-dependend phosphorylation level was achieved. Nevertheless there was no hint of an additional profibrotic effect in presence of I-1.



## 2. Summary

---

To sum up, a modulation of  $\beta$ -adrenic pathway can regulate fibrosis to a certain extent. How far this concept can be conveyed to the conditions *in vivo* remains to be seen. *In vivo* fibroblasts constantly interact with cardiomyocytes.

## 3. Einleitung

### 3.1 Herzinsuffizienz

#### 3.1.1 Allgemeines

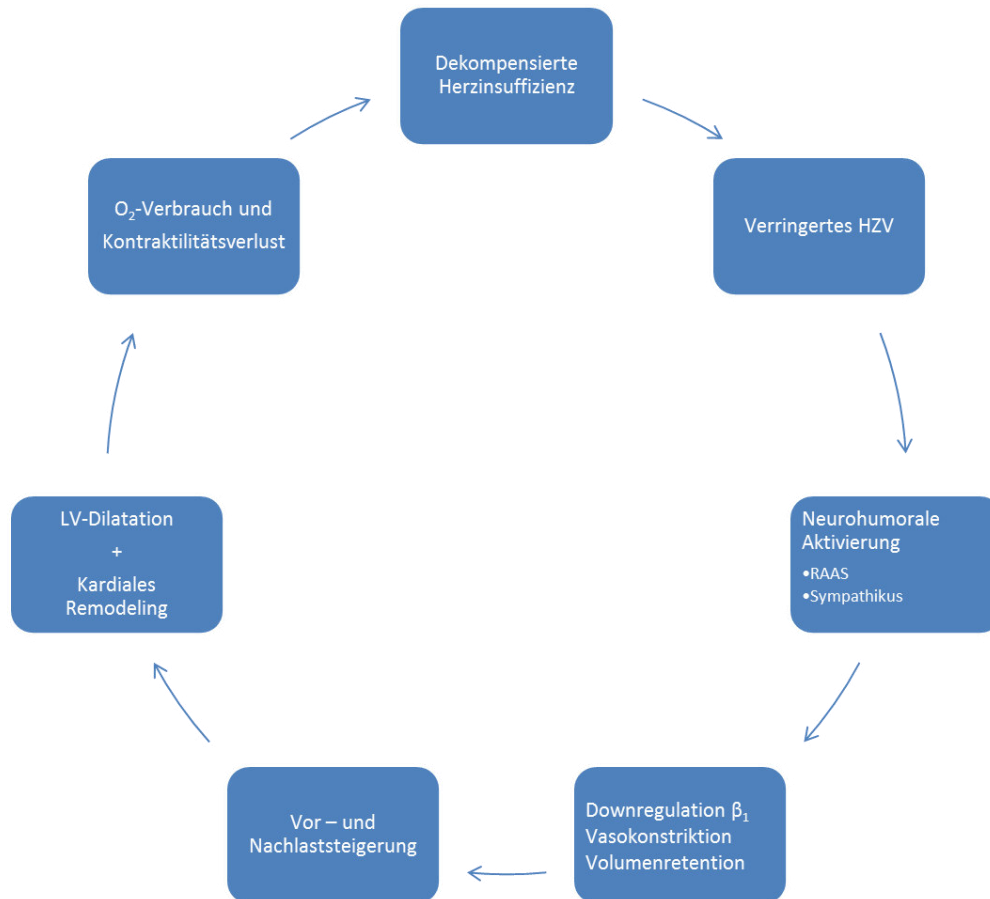
Die Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten internistischen Erkrankungen in der Medizin dar. Weltweit belaufen sich die Schätzungen auf mehr als 24 Millionen Menschen, die von einer Herzinsuffizienz betroffen sind (Kapur *et al.* 2012). Die Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung ist sowohl alters- als auch geschlechtsabhängig. Laut Angaben des Statistischen Bundesamtes war die Herzinsuffizienz im Jahre 2012 die am häufigsten gestellte Hauptdiagnose aller weiblichen Krankenhauspatienten in der Bundesrepublik Deutschland und auch bei den männlichen Patienten die häufigste Ursache einer Krankenhauseinweisung. Bei den Todesursachen rangierte sie im selben Jahr auf dem zweiten Platz hinter der chronisch-ischämischen Herzkrankheit. Die absolute Anzahl von Todesfällen durch Herzversagen wurde vom Statistischen Bundesamt auf 30.850 beziffert (Statistisches Bundesamt 2013). Damit hat sie sich innerhalb einer Zeitspanne von 6 Jahren vom dritten auf den zweiten Rang in dieser Statistik vorgeschoben und gewinnt immer mehr an Bedeutung. Unbestritten ist, dass die Prävalenz mit steigendem Alter deutlich zunimmt. Während schätzungsweise ca. 1% der Bevölkerung in der Altersgruppe zwischen 25-54 Jahren an einer Herzinsuffizienz leidet, steigt dieser Wert bei den 65-74-Jährigen auf 4-5% an. Bei den über 75-Jährigen wird sogar eine relative Häufigkeit von mehr als 10% angenommen (Kannel *et al.* 1994). Die Rate der Neuerkrankungen jenseits des 65. Lebensjahres betrug im Jahre 2012 10 von 1000 Einwohnern (Go *et al.* 2013). In den letzten Jahren konnten durch intensive Forschung Fortschritte in der Behandlung der Herzinsuffizienz erzielt werden, die sich auch in einem Rückgang der Sterblichkeit und Verbesserung der Lebensqualität bemerkbar machen. Jedoch bleibt die Prognose dieser Erkrankung auch unter medikamentöser Behandlung limitiert. Die jährliche Mortalitätsrate beträgt trotz Therapie bei Patienten mit moderaten oder ersten Symptomen zwischen 30 bis 60% (Sachse *et al.* 2012). Angesichts dieser Dimensionen wird deutlich, dass es sich bei der Herzinsuffizienz um eine ernst zu nehmende Volkskrankheit handelt und weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet der Forschung auch hinsichtlich neuer Therapiestrategien essentiell sind.

#### 3.1.2 Klinik der Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz unfähig ein angemessenes Herzzeitvolumen zu generieren, um das Gewebe mit ausreichend Blut und damit Sauerstoff zu versorgen. Je nach Lokalisation wird sie eingeteilt in eine Rechtsherz-, Linksherz- oder Globalinsuffizienz. Darüber hinaus unterscheidet man je nach Verlauf eine akute und chronische Form. Im Prinzip ist die Herzinsuffizienz keine eigenständige Erkrankung im engeren Sinne, sondern kann eher als ein Symptom betrachtet werden. Sie stellt den gemeinsamen Endpunkt ätiologisch unterschiedlicher Pathologien des Herzens dar. Zu diesen Pathologien zählen unter anderem die koronare Herzerkrankung, die verschiedenen Subtypen der Kardiomyopathie, Herzvitien, Herzrhythmusstörungen, Erkrankungen des Perikards und selten auch Infektionserkrankungen des Herzens. Der Hauptrisikofaktor zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist und bleibt aber die hypertensive Herzerkrankung (McMurray und Stewart 2000). Sie ist gekennzeichnet durch eine weitestgehend kompensatorische Phase mit charakteristischem hypertrophem Wachstum des Herzmuskels. Auf die einzelnen Kompensationsmechanismen wird weiter unten in diesem Abschnitt näher eingegangen. Im Verlauf versagen allerdings diese Kompensationsmechanismen und es kommt zu den klassischen Symptomen einer Herzinsuffizienz. In diesem Stadium spricht man dann von einer dekompensierten Herzinsuffizienz. Zu den Symptomen gehören bei der Linksherzinsuffizienz eine allgemeine verminderte Belastbarkeit und eine Belastungsdyspnoe mit Husten bedingt durch den Rückstau des Blutes in das pulmonale Gefäßbett. Dieser Zustand mündet nicht selten in ein klinisch manifestes Lungenödem (Kindermann 2007). Die Rechtsherzinsuffizienz geht klassischerweise mit einem Flüssigkeitsrückstau im Körperkreislauf einher, welcher sich klinisch in Form einer Ödembildung in den abhängigen Körperpartien oder als Aszites manifestiert (Cowie *et al.* 1997). Im Rahmen einer Rechtsherzinsuffizienz können unter anderem auch die Nieren und die Leber in Mitleidenschaft gezogen werden. Der Schweregrad der Erkrankung wird in der Regel klinisch nach der NYHA-Klassifikation (New York Heart Association) in 4 Stadien eingeteilt. Der Ausbruch der Symptome wird im frühen Stadium einer chronischen Herzinsuffizienz in der Regel durch entsprechende Kompensationsstrategien des Körpers zurückgehalten. So wird zur Aufrechterhaltung der Pumpleistung das sympathische Nervensystem verstärkt aktiviert, was in einer vermehrten Ausschüttung von Hormonen wie

Adrenalin und Noradrenalin resultiert (Thomas und Marks 1978). Dieser Mechanismus wird auch als neurohumorale Aktivierung bezeichnet. Die Katecholamine erzielen durch Stimulation der  $\beta_1$ -Rezeptoren in den Herzmuskelzellen positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Effekte. Es kommt also unweigerlich zu einer Erhöhung von Schlagkraft, Frequenz und Reizweiterleitung in Verbindung mit einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch des Herzens, um weiterhin die Blutversorgung der Peripherie zu gewährleisten. Die Katecholamine entfalten jedoch auch ihre Wirkung in der Peripherie, indem sie im arteriellen Gefäßsystem eine Vasokonstriktion, also eine Engstellung, herbeiführen mit einer konsekutiven Erhöhung der Nachlast. Auch die Hochregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist Teil der neurohumoralen Aktivierung. Innerhalb dieser Kaskade erfolgt die enzymatische Abspaltung von Angiotensin, in deren Folge das Hormon Aldosteron aus der Nebennierenrinde ausgeschüttet wird. Aldosteron wiederum führt durch Eingriff in den Elektrolythaushalt und renale Rückresorption zu einer Vergrößerung des Blutvolumens und damit Anhebung des Blutdrucks (Unger und Li 2004). Neben der humoralen Antwort auf das drohende Pumpversagen ist der Organismus auch durch mechanische Regulationsmechanismen fähig entgegenzusteuern. In diesem Kontext spielt der sogenannte Frank-Starling-Mechanismus eine tragende Rolle. Das Herz ist bei zunehmender Füllung der Ventrikel in der Lage, bis zu einem gewissen Grad seine Auswurfleistung den neuen Anforderungen anzupassen und zu optimieren. Das Ausmaß der Kontraktilitätssteigerung wird durch die Ruhedehnungskurve vorgegeben. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz sind diesem Mechanismus jedoch Grenzen gesetzt, auch ein völliges Versagen abhängig vom Schweregrad der Erkrankung ist möglich (Kitzman *et al.* 1991). Die Kompensationsmechanismen kommen kurzfristig der Perfusion des Organismus zugute, auf lange Sicht jedoch fügen sie dem Herzen mehr Schaden als Nutzen zu. Die humorale und mechanische Umstellung ist der Anstoß zu einer strukturellen Veränderung des Herzens in Form einer Herzmuskelhypertrophie und bei chronischer Belastung auch einer Herzfibrose. In diesem Zusammenhang fällt häufig der Begriff „kardiales *Remodeling*“. Sowohl der Aktivierung des RAAS als auch der  $\beta$ -adrenergen Überstimulation wird eine entscheidende Beteiligung an diesen Umbaumaßnahmen zugeschrieben (McEwan *et al.* 1998).

### 3. Einleitung



**Abbildung 1: Circulus vitiosus der dekompensierten Herzinsuffizienz.** Ohne therapeutische Intervention mündet die dekompensierte Herzinsuffizienz unweigerlich in die oben dargestellte Endloschleife mit Progress der Erkrankung. Im Stadium der Kompensation kommt es zu einer neurohumoralen Aktivierung. Die beiden prominentesten Vertreter dieser humoralen Antwort sind das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und die Sympathikusaktivierung. Langfristig reagiert das geschwächte Herz infolge der veränderten Kreislaufverhältnisse und der dauerhaften humoralen Stimulation mit einer strukturellen Modifikation zwecks Anpassung. Das sogenannte „kardiale Remodeling“ wirkt sich ungünstig auf den Krankheitsverlauf aus. Der Kreislauf beinhaltet nicht nur eine Aufrechterhaltung der Dekompensation, sondern darüber hinaus eine weitere Zustandsverschlechterung.

Therapeutisches Ziel der Behandlung einer Herzinsuffizienz ist die medikamentöse Unterbrechung des *Circulus vitiosus*, der ohne Intervention eine Degeneration des Herzmuskels zur Folge hat (Abb. 1). Die Anwendung der einzelnen Therapeutika er-

folgt stadiengerecht und ist klar definiert. Mittel der Wahl in allen Stadien der Herzinsuffizienz ist der ACE-Hemmer, dessen Angriffspunkt das RAAS ist. Erwiesenermaßen wird dem ACE (*Angiotensin-converting enzyme*)-Hemmer eine Prognoseverbesserung attestiert und ist deshalb unentbehrlich in der Therapie der Herzinsuffizienz (Flather *et al.* 2000). Ab dem zweiten Stadium wird ergänzend ein  $\beta$ -Blocker in das Therapieregime aufgenommen. Dieser macht es sich zur Aufgabe die Sympathikusaktivierung am Herzen durch kompetitive Hemmung der entsprechenden Rezeptoren zu drosseln, um eine Entlastung des Herzens zu erreichen. Das Stadium NYHA III rechtfertigt die Gabe eines Diuretikums und eines Aldosteronantagonisten wie Spirolacton. Beide greifen in den Wasser- und Elektrolythaushalt des Organismus ein mit dem Ziel die Vor- und Nachlast des Herzens zu minimieren. Eine Blutdrucksenkung wirkt sich günstig auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz aus. Bei einer therapieresistenten Verlaufsform können ab dem dritten Stadium auch wahlweise Digitalisglykoside eingesetzt werden. Durch Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sorgen sie für einen Calciumeinstrom in die Zelle und haben damit positiv inotrope Eigenschaften bei gleichzeitiger Senkung der Herzfrequenz. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Therapeutika ist ihr Einsatz rein symptomatischer Natur, d.h. sie verbessern nicht die Prognose der Erkrankungen (Swedberg *et al.* 2005). Auch ihrer niedrigen therapeutischen Breite ist es geschuldet, dass sie nur mit Vorsicht ihre Einsatzberechtigung finden.

## **3.2 Kardiale Sympathikusaktivierung: $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten**

### **3.2.1 $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion unter physiologischen Bedingungen**

Das Herz besitzt die Fähigkeit innerhalb kurzer Zeit das Herzminutenvolumen um ein Vielfaches, genau genommen um das Sechsfache, auf den Wert 30 Liter/Minute zu steigern. Das Herzminutenvolumen setzt sich zusammen aus dem Produkt der Herzfrequenz und dem Herzschlagvolumen. Beide Parameter können unabhängig voneinander variiert werden. Besonders die im Herzen vorkommenden  $\beta$ -Rezeptoren besitzen die Fähigkeit die Herzleistung durch Beeinflussung beider Variablen zu modulieren.

ren. Ein Großteil der kardialen  $\beta$ -Rezeptoren, ca. 70-80%, sind dem  $\beta_1$ -Subtypen zuzuordnen. Der  $\beta_2$ -Subtyp macht im Herzen etwa 20-30% aus (Bristow 2000). Beide Subtypen sind assoziiert mit einem Anstieg der Herzfrequenz und der Kontraktilität. Es gibt aber auch Hinweise für die Existenz von  $\beta_3$ -Rezeptoren, die mengenmäßig im Herzen eher eine untergeordnete Rolle spielen und funktionell entgegengesetzt zu  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren eine negativ inotrope Wirkung ausüben (Lohse *et al.* 2003). Die prominentesten Mediatoren der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion sind Adrenalin und Noradrenalin, die physiologisch in Stresssituation ausgeschüttet werden. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor setzt die Signaltransduktion in Gang. Ein entscheidender Zwischenschritt in der Kaskade ist dabei die Freisetzung des sekundären Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) durch die membranständige Adenylylzyklase (AC). Die Kommunikation zwischen diesem Enzym und dem Rezeptor wird durch sogenannte G-Proteine vermittelt. Im Falle der  $\beta_1$ -Rezeptoren handelt es sich dabei um ein stimulierendes  $G_s$ -Protein. Dieses ist aus drei Untereinheiten mit den Bezeichnungen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  zusammengesetzt. Im ruhenden Zustand bindet die  $\alpha$ -Untereinheit GDP. Kommt es nun zur Stimulation des Rezeptors, wird GDP durch GTP ersetzt, was eine Abspaltung dieser Untereinheit von den beiden anderen zur Folge hat. Die mit GTP-beladene  $G\alpha_s$ -Untereinheit besitzt nun die Fähigkeit die AC zu aktivieren (Hamm 1998). Diese katalysiert in der Folge die Reaktion von ATP zu cAMP. Die Hauptzielstruktur vom cAMP ist die Proteinkinase A (PKA), die für die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine verantwortlich ist. Die PKA setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, zwei von diesen bilden die regulierende und die anderen beiden die katalytische Untereinheit (Davies *et al.* 1994). cAMP dockt an die regulierende Untereinheit, wodurch die katalytische Untereinheit in den aktiven Zustand versetzt wird. Die Phosphorylierung der Proteine durch die PKA erfolgt an Serin- oder Threonin-Resten und kann je nach Protein eine Aktivierung oder Hemmung induzieren. Es existieren jedoch auch Gegenmechanismen zum Schutz vor einer unkontrollierten Stimulation, die in die Abläufe der Signaltransduktion eingreifen. Die Intervention kann auf zwei unterschiedlichen Stufen der Kaskade erfolgen. Zum einen ist die Zelle mit Phosphodiesterasen (PDE) ausgestattet, die das cAMP in inaktives 5-AMP überführen können (Torphy *et al.* 1992). Zum anderen ist die Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Thyrosinresten der Zielproteine durch Proteinphosphatasen (PP)

vollständig reversibel. Im Gegensatz zum  $\beta_1$ -Rezeptor ist der  $\beta_2$ -Rezeptor neben dem stimulierenden  $G_s$ -Protein auch an ein inhibitorisches  $G_i$ -Protein gekoppelt. Aufgrund dieser Konstellation führt die Aktivierung des  $\beta_2$ -Rezeptors zeitabhängig auch zu einer Reduktion der Kontraktilität. Zu Beginn der Stimulation besitzt der  $\beta_2$ -Rezeptor eine höhere Affinität zum  $G_s$ -Protein. Die zunehmende Aktivierung der PKA führt zu einer Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Rezeptors. Dieser Mechanismus ist mit einer Verschiebung der Affinität zugunsten des  $G_i$ -Proteins assoziiert (Devic *et al.* 2001).

In den Kardiomyozyten sind die Phosphorylierungsprozesse essentiell für die Calciumhomöostase der Zelle und vermitteln auf diesem Weg die positive Inotropie, Lusitropie und Chronotropie, also die Steigerung der Kontraktilität, der Relaxationsfähigkeit sowie der Herzfrequenz. Die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzelle ist abhängig von dem Calciumgehalt im Zytosol. Die Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade bewirkt eine Phosphorylierung der membranständigen L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (Dihydropyridinrezeptoren), die nun einen Calciumeinstrom entlang des elektrochemischen Gradienten in das Zellinnere zulassen (Trautwein *et al.* 1990). Der Calciumgehalt in der Zelle wird noch zusätzlich gesteigert, indem das einströmende Calcium an den Ryanodin-Rezeptor bindet und so eine weitere Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum, dem zellulären Calciumspeicher, triggert. In der Folge bindet das zytosolische Calcium an Troponin C und leitet so den Kontraktionszyklus ein. Die erhöhte Phosphorylierungsaktivität nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation geht also folglich mit einer Inotropiesteigerung einher. Aber auch die Lusitropie, also die Fähigkeit des Herzmuskels zur Erschlaffung, ist an den Phosphorylierungsstatus von Zellproteinen gebunden. Der Muskel relaxiert im Zuge der Abnahme des zytosolischen Calciumgehaltes. Dies geschieht unter anderem durch die Wiederaufnahme des Calciums ins sarkoplasmatische Retikulum über eine  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA=*Sarcoplasmatic/-Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase*). Die Regulation dieser ATPase wird durch Phospholamban (PLB) übernommen, welches cAMP/PKA-abhängig nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation phosphoryliert wird. Im phosphorylierten Zustand hebt sie die Hemmung der SERCA durch PLB auf, sodass das Calcium aktiv in das sarkoplasmatische aufgenommen und gespeichert werden kann (MacLennan und Kranias 2003). Weitere Substrate der PKA, die in die



Calciumhomöostase der Herzmuskelzelle involviert sind, sind das Troponin I und das Myosin-Binding-Protein C.

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch kardiale Fibroblasten über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren verfügen und damit eine potenzielle Zielstruktur sympathischer Aktivierung darstellen (Aránguiz-Uroz *et al.* 2011)

Innerhalb der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade hat auch der Proteinphosphatase-Inhibitor-1 (Inhibitor-1) eine wichtige Bedeutung. Seine PKA-abhängige Phosphorylierung verstärkt zusätzlich die Effekte einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation. In diesem aktivierten Zustand inhibiert er die katalytische Untereinheit der dephosphorylierenden PP-1 (El-Armouche *et al.* 2008) und leistet so einen entscheidenden Beitrag zum Erhalt der Phosphorylierung.

#### **3.2.2 Veränderungen der $\beta$ -adrenergen Kaskade in der Herzinsuffizienz**

Ein bekanntes Phänomen einer chronischen Exposition des Herzens gegenüber Katecholaminen im Stadium einer Herzinsuffizienz ist die Desensitivierung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren (Benovic *et al.* 1988). Bereits innerhalb kurzer Zeit kommt es zu einer Phosphorylierung der besetzten Rezeptoren durch die verstärkte  $\beta$ -AR-Kinase-Aktivität ( $\beta$ ARK1 = GRK2), was in einer Entkopplung des Rezeptors von dem  $G_s$ -Protein und einer Internalisierung des Rezeptors endet (Hausdorff *et al.* 1990). Weiterhin kann man im Verlauf eine Verminderung der  $\beta$ -AR-Dichte und eine Zunahme des  $G_i$ -Proteins feststellen (El-Armouche und Eschenhagen 2009). In den Kardiomyozyten betrifft die Desensitivierung besonders den  $\beta_1$ -Rezeptor und hat eine Verschiebung des Rezeptorverhältnisses auf 1:1 zur Folge. Das Ausmaß der Reduktion an  $\beta$ -Rezeptoren korreliert dabei mit der Schwere der Erkrankung (Kiuchi *et al.* 1993, Engelhardt *et al.* 1996). All diese Veränderungen tragen zu einem verminderten Ansprechen des Herzens auf Katecholamine bei (Choi *et al.* 1997). Kontrovers diskutiert werden die Konsequenzen eines solchen Regulationsmechanismus. Einerseits kann die Desensitivierung als adaptiver Schutzmechanismus des Herzens interpretiert werden, da auf

diese Weise die Gefahr einer Arrhythmie, Hypertrophie, Apoptose und Energieungleichgewichts nach  $\beta$ -adrenerger Überstimulation entschärft wird (Lohse *et al.* 2003). Unterstützt wird diese Sichtweise durch einen Blick auf die bewährte Pharmakotherapie einer Herzinsuffizienz. Lange erwiesen ist der prognoseverbessernde Einsatz von Beta-Blockern bei Herzversagen (Doughty *et al.* 1997). Sie funktionieren nach dem Prinzip der kompetitiven Hemmung und schützen das Herz vor dem Einfluss von Katecholaminen, was vergleichbar ist mit dem Zustand nach Desensitivierung. Im Gegensatz dazu stehen Therapiestrategien, die durch den Versuch eine Desensitivierung mit einem Katecholaminüberschuss zu kompensieren eine Mortalitätszunahme zur Folge haben und deshalb als kontraproduktiv anzusehen sind (O'Connor *et al.* 1999). Andererseits muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die Desensitivierung dem Herzen die Fähigkeit beraubt, in Belastungssituationen seine Leistung dem Bedarf anzupassen (Eschenhagen 2008). In der Summe wird der Mechanismus von Experten allerdings als protektive Adaptation bewertet (El-Armouche und Eschenhagen 2009).

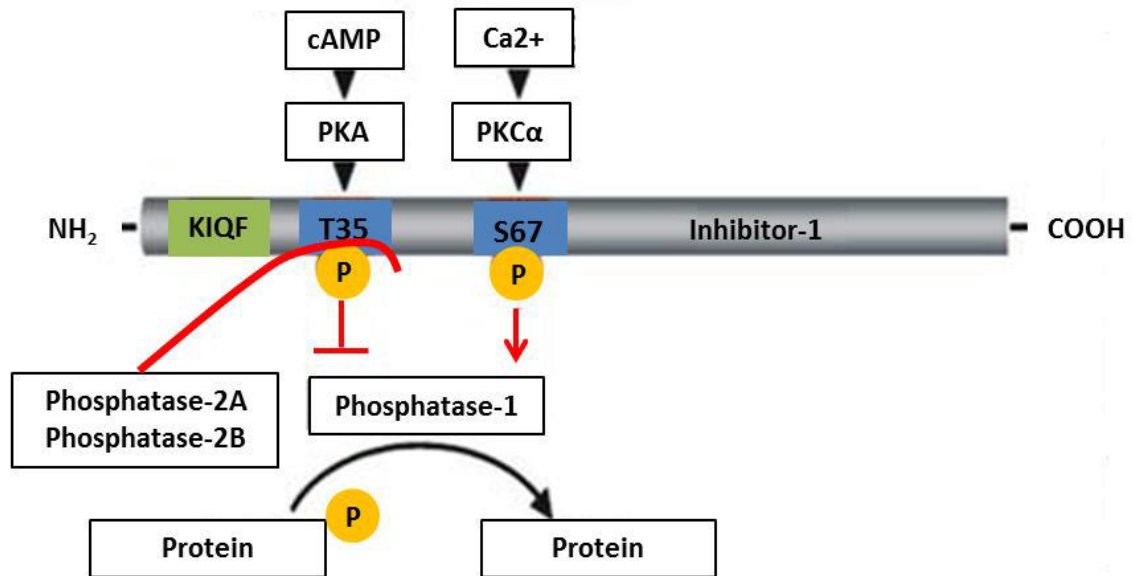
### **3.3 $\beta$ -adrenerge Signalverstärkung: Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 in Kardiomyozyten**

Der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) ist ein selektiver und hochpotenter Hemmer der PP-1. Es handelt sich dabei um ein kleines Protein aus 171 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 32 kDa (Elbrecht *et al.* 1990, Wittköpper *et al.* 2011). Auffällig ist unter anderem, dass es charakteristische Elemente einer Sekundärstruktur vermissen lässt. Diesem Merkmal ist es wahrscheinlich auch zu verdanken, dass der I-1 thermo- und säurestabile Eigenschaften aufweist und auch widerstandsfähig gegenüber Detergenzien und Lösungsmitteln ist (Nimmo und Cohen 1978). Der I-1 wurde zum ersten Mal von Huang und Glinsmann im Jahre 1978 im Skelettmuskel von Kaninchen entdeckt. Mengenmäßig wird er am stärksten im Gehirn, in Fettzellen, Niere und Skelettmuskel exprimiert (MacDougall *et al.* 1989), in Herz und Lunge dagegen ist der I-1 in etwas geringeren Konzentrationen (Neumann *et al.* 1991, Gupta *et al.* 1996) vertreten. Besonders in erregbarem Gewebe wie Gehirn und Herz kommt dem I-1 eine

wichtige Bedeutung zu, wo er im Zusammenhang mit Vorgängen rund um die neuronale Plastizität und Kontraktilität des Herzmuskels in Erscheinung tritt (Sahin *et al.* 2006). Im Herzen scheint er zum größten Teil (ca. 80%, Gupta *et al.* 2003) am sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert zu sein. Eine Phosphorylierung an der Stelle T35 durch die PKA versetzt den I-1 in den aktiven Zustand und befähigt ihn die katalytische Untereinheit der PP-1 auszuschalten (Cohen 1988). Maßgeblich für die Interaktion des I-1 mit der PP-1 ist die KIQF-Sequenz (Eto *et al.* 2004). Es handelt sich hierbei um eine N-terminale Tetrapeptid-Sequenz, die auch in anderen Regulatoren der PP-1 wiederzufinden ist. Sie ist der Schlüssel zur Bindung und Inhibierung des Enzyms (Connor *et al.* 2000). Diese Fähigkeit macht den I-1 zu einem effektiven Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade, indem er das PKA-abhängige Phosphorylierungsniveau in der Zelle anhebt (El-Armouche *et al.* 2003). Die Arbeitsgruppe um Cohen konnte zeigen, dass die basale Phosphorylierungsrate des I-1 im Herzen und in der Skelettmuskulatur ca. 30% beträgt und nach Verabreichung von Adrenalin bis auf 70% gesteigert werden kann (Aitken und Cohen 1982). In weiteren Untersuchungen konnte dann ein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsniveau von PLB und dem Aktivitätsstatus des I-1 nachgewiesen werden (Iyer *et al.* 1988). Durch Überexpressionsversuche mit I-1 konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass das Kontraktionspotenzial der Zellen zunimmt und die Sensitivität gegenüber Katecholaminen positiv beeinflusst wird (El-Armouche *et al.* 2003), was die These einer Verstärkerfunktion des I-1 unterstützt. Die Phosphorylierung an der Stelle T35 kann aber auch genauso wieder aufgehoben werden. Diese Aufgabe entfällt auf die PP-2A und 2B aus der Klasse der Typ-2 Serin/Threonin-Phosphatasen (El-Armouche *et al.* 2006). Dabei ist die Aktivität der PP-2B an die Anwesenheit von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  gekoppelt, sodass der I-1 auch als Bindeglied der beiden wichtigsten intrazellulären sekundären Botenstoffe  $\text{Ca}^{2+}$  und cAMP betrachtet werden kann (Sahin *et al.* 2006). Der I-1 ist aber auch ein Substrat der ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Proteinkinase  $\text{C}\alpha$ , die eine Phosphorylierung an der Stelle S67 vornimmt. Im Gegensatz zu der Phosphorylierung an T35 durch PKA wird in diesem Fall eine Aktivitätsminderung des I-1 erreicht (Braz *et al.* 2004, Sahin *et al.* 2006). Eine weitere Phosphorylierungsstelle der  $\text{PKC}\alpha$  mit anschließender Aktivitätsabnahme befindet sich an T75 (Rodriguez *et al.* 2007). In beiden Fällen hat die Phosphorylierung eine gesteigerte Aktivität der PP-1 zur Folge, weil die Hemmung durch

den I-1 entfällt. Funktionell macht sich dies durch eine verminderte kontraktile Reserve bemerkbar (Rodriguez *et al.* 2007, Rodriguez *et al.* 2006).

Eine Betrachtung des I-1 im insuffizienten Herzen veranschaulicht einerseits die Regulation des Proteins als auch seine übergeordnete Funktion. Mengenmäßig lässt sich in diesem Stadium ein Rückgang des I-1 und auch ein vermehrtes Vorliegen in dephosphorylierter Form beobachten (El-Armouche *et al.* 2004), sodass insgesamt eine Aktivitätsminderung zu verzeichnen ist. Die Arbeitsgruppe um El-Armouche konnte experimentell eine Reduktion des I-1-Proteinlevels um 58% und eine um 77% geminderte Phosphorylierung des I-1 in insuffizienten menschlichen Herzen feststellen. Diese Verschiebungen können plausibel mit der Herunterregulation der  $\beta$ -AR bei Herzinsuffizienz erklärt werden. Die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung geht automatisch mit einem niedrigeren cAMP-Niveau und damit auch einer Hypophosphorylierung des I-1 einher. In der Tat konnte auch in Tiermodellen gezeigt werden, dass eine chronische Isoprenalinstimulation zu verminderten I-1-mRNA- und Proteinspiegeln führt (El-Armouche *et al.* 2007). Darüber hinaus steuert auch die vermehrte Aktivität der PP-2B in der Herzinsuffizienz zu einer Dephosphorylierung des I-1 bei (Wittköpper *et al.* 2011). Die theoretische Überlegung, dass eine verminderte I-1-Aktivität eine zunehmende Dephosphorylierung von Zielproteinen wie PLB nach sich ziehen müsste, konnte in Versuchen bestätigt werden (El-Armouche *et al.* 2004). Folglich kommt es zu einer verminderten SR-Beladung (Wittköpper *et al.* 2010) mit reduzierter Kontraktilität der Myozyten. Wie die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung wird auch die Reduktion von I-1 im Rahmen der Herzinsuffizienz als ein möglicher Schutzmechanismus diskutiert. So konnte demonstriert werden, dass I-1 Knockout-Mäuse vor Katecholamin-induzierten Arrhythmien und einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz geschützt waren (El-Armouche *et al.* 2008).



**Abbildung 2: Regulationsmechanismen des Inhibitor-1.** Die Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade bewirkt über eine Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA eine Phosphorylierung des I-1 an der Stelle T35. Dies ist gleichbedeutend mit einer Aktivitätszunahme des Proteins und über eine Inhibierung der PP-1 einer Anhebung des Phosphorylierungsniveaus in der Zelle. Die Interaktion wird von der KIQF-Sequenz des I-1 vermittelt. Eine Phosphorylierung an der Stelle S67 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige PKC $\alpha$  hat den gegenteiligen Effekt im Sinne einer Deaktivierung des Proteins zur Folge. Als Konsequenz ergibt sich eine Aufhebung der PP-1-Hemmung und somit eine progrediente Dephosphorylierung von Phosphoproteinen. Auf makroskopischer Ebene wird durch dieses Verstärkerelement Einfluss auf die Kontraktion bzw. Relaxation in Kardiomyozyten genommen. Die Phosphorylierung des I-1 an der Stelle T35 ist jedoch auch reversibel. Eine Dephosphorylierung an dieser Stelle kann durch die PP-2A und 2B erfolgen. Durch diesen Vorgang wird der I-1 in seinen inaktiven Zustand versetzt und die Hemmung der PP-1 wird aufgehoben. Auf diese Weise steigt das Phosphorylierungsniveau in der Zelle an.

## 3.4 Kardiale Fibroblasten

### 3.4.1 Allgemeines

Kardiale Fibroblasten stellen die Mehrheit an Zellen im kardialen Gewebe mit einem Anteil von 64% in Rattenherzen und 72% im menschlichen Herzen. Die Kardiomyozyten hingegen machen nur 30% bzw. 28% aller Zellen aus, wenngleich sie aufgrund ihrer Größe die eigentliche Masse des Herzmuskels stellen (Banerjee *et al.* 2007). Während in der Vergangenheit den Kardiomyozyten in der Forschung mehr Beachtung zukam, stehen die kardialen Fibroblasten heute immer mehr im Blickpunkt. Sie sind gleichmäßig über dem gesamten kardialen Gewebe verteilt und umschließen die Kardiomyozyten. Der Raum zwischen den Kardiomyozyten ist folglich mit Fibroblasten überbrückt (Camelliti *et al.* 2005). Sie sind Zellen mesenchymalen Ursprungs und werden im Allgemeinen auf ihre Kollagenproduktion beschränkt (Baudino *et al.* 2006). Jedoch stellt man bei näherer Betrachtung schnell fest, dass sie viel komplexere Funktionen innerhalb des kardialen Netzwerks übernehmen, deren Bedeutung bis heute nicht gänzlich erschlossen ist. Durch ihren direkten Kontakt zu den Kardiomyozyten haben sie die optimalen Voraussetzung um einen entscheidenden Beitrag zu strukturellen, biochemischen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften des Arbeitsmyokards zu leisten (Camelliti *et al.* 2005). In erster Linie sind sie für die Synthese und Aufrechterhaltung des dreidimensionalen Gerüsts zuständig, in welches die Kardiomyozyten eingebettet sind (Eghbali 1992). Das Gerüst besteht aus der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM) und beinhaltet neben Kollagen unter anderem Proteoglykane, Glykoproteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen (Corda *et al.* 2000). Die strukturelle Anordnung der EZM gewährleistet eine effiziente und gleichmäßige Verteilung der einwirkenden Kraft über das gesamte Herz durch Übertragung mechanischer Signale auf einzelne Zellen. Zudem trennt es in Form des *Anulus fibrosus* elektrisch den Vorhof von den Kammern (Krenning *et al.* 2010). Adäquate Stimuli, auf die kardiale Fibroblasten mit der Sekretion von Kollagen Typ I und III als auch Elastin und Laminin reagieren, sind zum Beispiel Wachstumshormone, Zytokine oder auch mechanischer Stress (Bosman und Stamenkovic 2003, Krenning *et al.* 2010). Fibroblasten sind für die gesamte Homöostase der EZM zuständig, d.h. sie steuern nicht

nur ihren Aufbau sondern auch den Abbau durch Sekretion von Matrixmetalloproteasen (Tsuruda *et al.* 2003). Fibroblasten tragen auch zur elektrischen Signalweiterleitung im Herzen bei (Kamkin *et al.* 2003). Dabei haben sie die Möglichkeit sowohl passiv als auch aktiv in die Elektrophysiologie des Herzens einzugreifen. Da es sich bei den Fibroblasten um nicht erregbare Zellen handelt und sie zwischen den Kardiomyozyten positioniert sind, stellen sie zusammen mit der EZM einen Widerstand für die Erregungsweiterleitung dar (Krenning *et al.* 2010). Neuere Studien belegen allerdings, dass Fibroblasten durch ihre mechanosensitiven Eigenschaften auch in der Lage sind, aktiv elektrische Signale an Kardiomyozyten weiterzuleiten (Li *et al.* 2009, Isenberg *et al.* 2003). Durch Bildung und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren können die kardialen Fibroblasten Einfluss auf Wachstum, Proliferation und Funktion von Kardiomyozyten nehmen (Ottaviano und Yee. 2011). Die Kommunikation zwischen beiden Zelltypen erfolgt aber nicht nur auf parakrinem Weg, sondern auch durch direkten Zellkontakt über Connexine (Souders *et al.* 2009).

Die kardialen Fibroblasten leisten einen ganz entscheidenden Beitrag zu der Reorganisation nach myokardialem Infarkt oder Verletzungen am Herzen. Durch Chemotaxis werden sie an den Ort der Verletzung geführt (Brown *et al.* 2005). Hier sind Proliferation und ein nachfolgender Anstieg der Matrixproduktion erwünscht, sodass eine Narbe am Zielort entstehen kann mit dem übergeordneten Ziel die Integrität des kardialen Gewebes aufrechtzuerhalten (Sun *et al.* 2000).

#### **3.4.2 Kardiale Fibrose**

Die kardiale Fibrose tritt neben der Hypertrophie des Herzmuskels im Zuge des kardialen Remodeling auf. Die Umbauprozesse am Herzen betreffen sowohl die kardialen Fibroblasten als auch die Kardiomyozyten zugleich. Das neurohumorale Ungleichgewicht ist ein entscheidender Faktor in diesem Zusammenhang. Insbesondere die chronische Aktivierung des RAAS steht im Verdacht das Remodeling voranzutreiben. So bewirkt die übermäßige Freisetzung von Angiotensin II eine Steigerung der DNA-Synthese in Fibroblasten und eine vermehrte Proteinproduktion sowohl in Fibroblasten als auch Kardiomyozyten. Durch seine zytotoxischen Effekte auf Kardiomyozyten fördert

es die Entwicklung einer fortschreitenden Fibrotisierung des Herzgewebes durch Induktion von Apoptose und Nekrose. Das nach Aktivierung des RAAS ebenfalls freigesetzte Aldosteron stimuliert zusätzlich die Kollagensynthese der Fibroblasten und induziert wahrscheinlich durch Eingriff in den Salzhaushalt den Untergang der Kardiomyozyten (Cohn *et al.* 2000). Jedoch sind auch andere Mediatoren wie zum Beispiel andere neurohumorale Faktoren, Zytokine, Wachstumshormone, Ionenkanäle, oxidativer Stress und mechanischer Stress für den Veränderungsprozess verantwortlich. Letztendlich kann zusammengefasst eine initiale Kardiomyozytenhypertrophie gefolgt, von Kardiomyozytenverlust und eine zunehmende Fibrotisierung des Gewebes beobachtet werden, die wiederum gekennzeichnet ist durch Proliferation und Persistenz von Myofibroblasten sowie der überschießenden Produktion von EZM-Bestandteilen (Takano *et al.* 2003). Im Folgenden sollen besonders die Umbauprozesse in den kardialen Fibroblasten dargestellt werden, die eine Fibrose begünstigen.

Kardiale Fibroblasten sind per se unerlässlich für die strukturelle Integrität und einwandfreie Funktion des gesunden Herzens. Erst die unkontrollierte Synthese von EZM-Bestandteilen, insbesondere Kollagen, führt zu einer pathologischen Fibrose und behindert im Verlauf die Relaxierung und Kontraktion des Herzens (Fan *et al.* 2011). Der Überschuss an Kollagen sorgt einerseits für eine zunehmende Versteifung des Herzmuskels, andererseits stellt es aber auch ein Hindernis für die Erregungsweiterleitung des Herzens dar und kann im Zuge der Fibrose zu Rhythmusstörungen, Herzversagen und plötzlichem Herztod führen (Sovari und Karagueuzian 2011). Neben der chronischen Aktivierung des RAAS wird vor allem auch die mechanische Überlastung des Herzens für die Entwicklung in Richtung einer Fibrose verantwortlich gemacht. In Experimenten konnte verdeutlicht werden, dass die mechanische Überlastung des Herzens eine vermehrte Produktion von Kollagen I und eine verminderte Aktivität von Kollagenasen nach sich zieht (Bishop und Lindahl 1999, López *et al.* 2004). Die kardiale Fibrose lässt sich in zwei Unterformen einteilen, die reaktive interstitielle Fibrose und die verdrängende Fibrose (Anderson *et al.* 1979). Die initiale reaktive interstitielle Fibrose stellt eine adaptive Antwort dar mit dem Ziel dem zunehmenden Druck standzuhalten. Diese Form der Fibrose geht nicht mit einem Verlust an Kardiomyozyten einher. Im Gegensatz dazu ist die verdrängende Fibrose durch eine Hypertrophie und anschließender Nekrose der Herzmuskelzellen charakterisiert (Krenning *et al.* 2010).



Die übermäßige Produktion von EZM ist eng verknüpft mit der Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die nachweislich eine höhere Syntheserate an Kollagen aufweisen (Lijnen und Petrov 2002). Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass sich diese Zellform häufig in Wundgewebe im Rahmen von Reparationsvorgängen findet und dort sowohl für die Organisation der EZM als auch für die Wundkontraktion verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um spezialisierte kontraktile Fibroblasten, die während der physiologischen Wundheilung Spannung generieren, aber auch zu pathologischen Kontrakturen (Powell *et al.* 1999) mit Behinderung der Organfunktion führen können. Im Normalfall werden die Myofibroblasten nach Abschluss der Wundheilung gezielt in die Apoptose getrieben. Wird das Wundheilungsprogramm jedoch nicht adäquat terminiert, verbleiben die Myofibroblasten in den Läsionen und sind dann maßgeblich an der Entstehung von Narbengewebe beteiligt (Moulin *et al.* 2004). Ein anerkannter Mediator dieser Transformation und damit auch der übersteigerten Kollagenproduktion ist TGF- $\beta_1$  (*transforming growth factor beta 1*) (Petrov *et al.* 2002), welches zu der Gruppe der Zytokine gezählt wird. Es wurde insbesondere ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Typ 1 Kollagen und dem Überschuss von TGF- $\beta_1$  festgestellt (Laviades *et al.* 2000). So fördert es nicht nur die Sezernierung von extrazellulärer Matrix, indem es die Expression der Matrixgene induziert (Ignatz und Massagué 1986), sondern vermindert auch die Expression von Metalloproteasen, die für den Abbau der extrazellulären Matrix zuständig sind. Gleichzeitig steigert es die Produktion der Inhibitoren der Metalloproteasen, sodass hier zusätzlich ein Abbau des Bindegewebes verhindert wird (Overall *et al.* 1991, Yuan und Varga 2001, Leask und Abraham 2003). TGF- $\beta_1$  kann einerseits von inflammatorischen Zellen (Desmoulière *et al.* 2005) als auch von Myofibroblasten selbst zur Aufrechterhaltung ihres eigenen Phänotypen gebildet werden (Petrov *et al.* 2002). Potenzielle Stimuli für die Ausschüttung dieses Zytokins sind zum Beispiel mechanischer Stress (Kessler *et al.* 2001) oder auch Angiotensin II (Campbell und Katwa 1997). Beide Stimuli wurden weiter oben im Text auch als mögliche Mediatoren einer Herzfibrose bzw. des kardialen Remodeling genannt. Somit lässt sich an dieser Stelle eine Brücke zwischen zellulären Mechanismen und der Klinik schlagen. Unter Berücksichtigung dieser Zusammenhänge lässt sich also konstatieren, dass die durch TGF- $\beta_1$ -vermittelte Umwandlung zu Myofibroblasten eine herausragende Rolle in der Pathophysiologie der

Fibrose einnimmt. In der Literatur ist darüber hinaus beschrieben, dass das von Myofibroblasten ausgeschüttete TGF- $\beta_1$  auch eine Hypertrophie von Kardiomyozyten herbeiführen kann (Gray *et al.* 1998). Dies berechtigt zur Annahme, dass TGF- $\beta_1$  nicht nur im Rahmen der Fibrose involviert ist, sondern im Gesamtkonzept des kardialen Remodeling Berücksichtigung finden muss. Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten kann anhand des spezifischen Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA (*alpha-smooth muscle actin*) verifiziert werden, welcher sich entlang der Mikrofilamente von Stressfasern organisiert (Darby *et al.* 1990). Die Expression von  $\alpha$ -SMA wird von TGF- $\beta_1$  über den Smad-Signalweg reguliert (Feng *et al.* 2005).  $\alpha$ -SMA ist mit seinen kontraktile Eigenschaften ein essentieller Bestandteil der Stressfasern von Myofibroblasten und befähigt diese zur Kontraktion (Hinz *et al.* 2001). Grundsätzlich sind die Stressfasern bestehend aus F-Aktinmikrofilamentbündeln,  $\alpha$ -Aktinin und Myosin zu einem kontraktilem Apparat zusammengesetzt, in welches  $\alpha$ -SMA eingebettet ist. Die Stressfasern sind über das  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, einen Rezeptor auf der Membranoberfläche der Myofibroblasten mit dem extrazellulären Fibronectin, welches einen wichtigen Bestandteil der EZM verkörpert, verbunden (Welch *et al.* 1990, Petroll *et al.* 1993). In diesem Sinne kommt die kontraktile Kraft des Gewebes durch ein Zusammenspiel von intrazellulären Aktinfasern und dem extrazellulären Fibronectin zustande, sodass eine Zugkraft auf die extrazelluläre Matrix entsteht (Petroll *et al.* 1993). Die Arbeitsgruppe um Petroll konnte im Wundgewebe der Kornea ein charakteristisches Muster bezüglich der Formation von Stressfasern in Myofibroblasten beobachten. Anders als die eher willkürliche Anordnung in ruhenden Fibroblasten richten sich die Fasern in den Myofibroblasten vorwiegend parallel zueinander in Richtung der Längsachse der Wunde aus.

Neben dem TGF- $\beta_1$  wurde das sezernierte Glykoprotein CTGF (*connective tissue growth factor*) in Verbindung mit der Entwicklung einer Fibrose gebracht. Es hat ein Molekulargewicht von 36-38 kDa und wird der CCN-Familie zugeordnet (Ihn 2002). Nach Synthese erfolgt die Sekretion durch den Golgi-Apparat (Chen *et al.* 2001). Durch Adhäsion an die Oberfläche seiner Zielzellen entfaltet es seine Wirkung. Diese Anlagerung wird dabei durch diverse Integrine vermittelt (Babic *et al.* 1999, Jedsadayamata *et al.* 1999, Chen *et al.* 2001). Isoliert wurde dieses Glykoprotein erstmalig in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (Bradham *et al.* 1991). CTGF wird unter

ruhenden Bedingungen nicht in adulten mesenchymalen Zellen exprimiert. Erst mit Beginn der Wundheilung lässt sich eine CTGF-Sekretion nachweisen (Leask 2007). Da die CTGF-Synthese vorwiegend durch TGF- $\beta_1$  stimuliert wird und beide in ihrer Funktion Parallelen aufzeigen, wird CTGF häufig als Downstream-Mediator von TGF- $\beta_1$  eingestuft (Grotendorst 1997). Zudem sind unter fibrotischen Bedingungen beide Mediatoren überexprimiert (Igarashi *et al.* 1995). Wie TGF- $\beta_1$  ist auch CTGF in der Lage die Transkription von extrazellulären Matrixproteinen wie  $\alpha_1$ -Typ-I-Kollagen,  $\alpha_5$ -Integrin und Fibronectin anzuregen und die Proliferation der Bindegewebszellen zu steigern (Frazier *et al.* 1996). Mittels Transfektion eines für CTGF-kodierenden Vektors in Fibroblasten konnte bewiesen werden, dass CTGF die Kollagen-4I-Synthese ganz unabhängig anstoßen kann (Shi-wen *et al.* 2000). In Tierversuchsmodellen von Mori und Mitarbeitern (1999) konnte durch Injektion von CTGF alleine eine transiente fibrotische Antwort provoziert werden, in Kombination mit TGF- $\beta_1$  hingegen wurde eine langanhaltende Fibrose erzeugt. Es ist also davon auszugehen, dass beide Faktoren besonders im Zusammenspiel miteinander an der Entwicklung einer Fibrose beteiligt sind.

Die dargestellten Mechanismen greifen natürlich auch bei der physiologischen Wundheilung und sind deswegen für die Integrität des Bindegewebes unverzichtbar. Erst der Überschuss an profibrotischen Faktoren kann in einen fibrotischen Zustand umschlagen. Dies wird dann begünstigt, wenn die regulatorischen Mechanismen, die eine Fibrose unterdrücken, außer Kraft gesetzt werden (Leask und Abraham 2003).

#### **3.4.3 Die Rolle der cAMP- und cGMP-abhängigen Signaltransduktion in Fibrosehemmung**

cAMP kommt eine Schlüsselrolle im Rahmen von Regulationsmechanismen in einer Vielzahl von Zelltypen zu. Das Wirkprofil und die Funktion des sekundären Botenstoffes können abhängig vom Gewebe und zugrundeliegendem Organismus unterschiedlich ausfallen. Es entfaltet dabei seine Wirkung über mehrere Mechanismen. Weiter oben im Text wurde bereits die Anlagerung an die regulatorische Untereinheit der PKA und die daraus resultierenden Effekte in Kardiomyozyten thematisiert. Während es

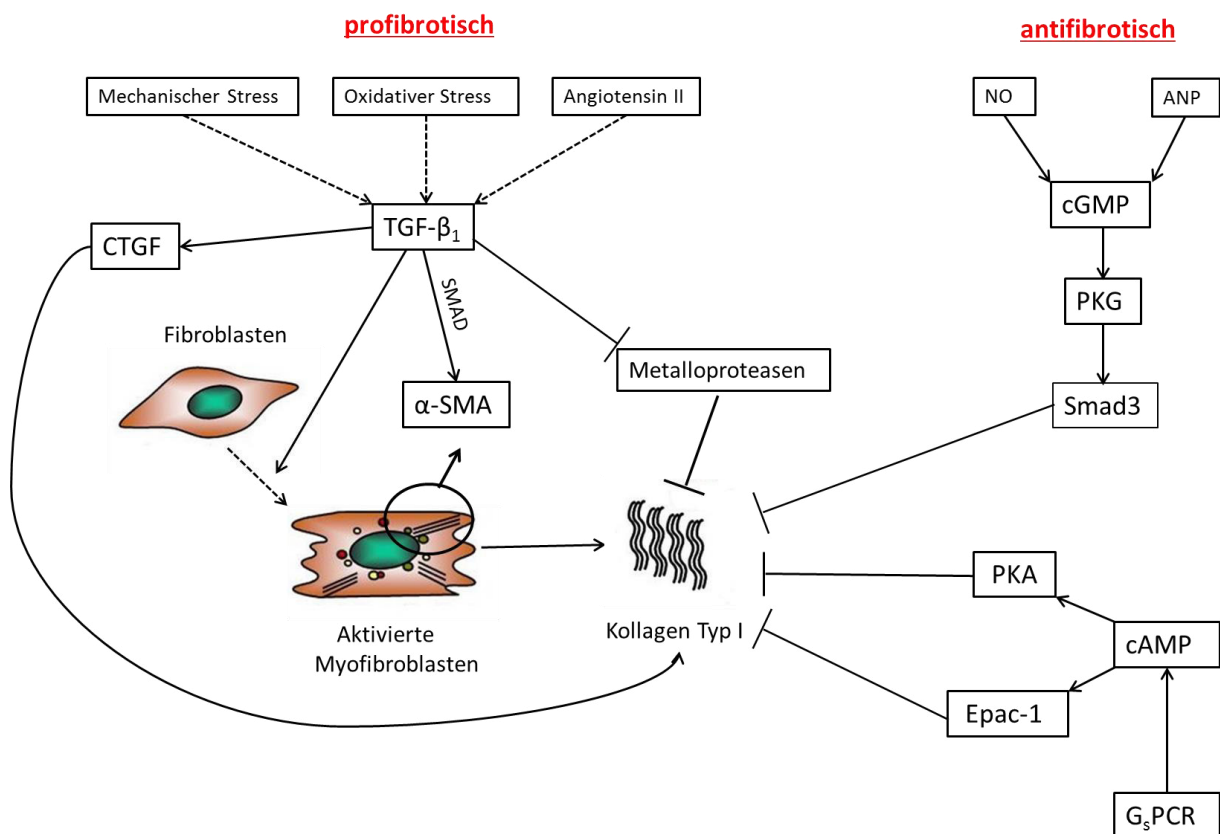
sich hierbei um indirekte Effekte von cAMP handelt, ergibt sich eine direkte unmittelbare Wirkung nach Bindung an Ionenkanäle und konsekutiver Aktivitätsänderung dieser (Gancedo 2013). In Kardiomyozyten spielen cAMP-abhängige HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated*)-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Herzfrequenzbildung. Daneben existiert auch eine Verbindung zwischen cAMP und der Aktivierung der monomeren GTPase Rap1. Während bei heterotrimeren G-Proteinen wie  $G_s$  der Austausch von GDP zu GTP über einen Rezeptor katalysiert wird, benötigen monomere G-Proteine spezielle Austauschfaktoren. Im Fall von Rap1 wird dessen Aktivierung durch das cAMP-abhängige Epac (*exchange protein activated by cAMP*) reguliert. Die Aktivierung von Rap1 führt in der Regel zu einer Änderung des zellulären Transkriptionsmusters und ist neben der Aktivierung der PKA ein weiterer wichtiger Effektormechanismus von cAMP. cGMP wird analog zum cAMP durch Guanylylzyklase erzeugt in Gegenwart von Stickstoffmonoxid (NO) oder natriuretischen Peptiden im Sinne einer Rezeptorstimulation. Die weitere Signaltransduktion beinhaltet eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) oder die cGMP-gesteuerte Regulation von Ionenkanälen.

Neuere Erkenntnisse (Yokoyama *et al.* 2008) weisen auf eine antifibrotische Wirkung cAMP und cGMP-abhängiger Signalkaskaden hin, nicht nur im Herzen, sondern auch in anderen vernarbenden Organen wie Niere oder Lunge. Bezüglich cAMP scheinen sowohl PKA als auch Epac 1 in diesem Kontext eine entscheidende Rolle einzunehmen. Die Tatsache, dass profibrotische Agonisten eine Hemmung der Epac-1-Expression bewirken, ist ein deutliches Indiz für diese Annahme. Im Gegenzug kann durch eine Epac-1-Überexpression die TGF- $\beta_1$ -vermittelte Kollagen-Synthese in Fibroblasten aufgehalten werden. Gemeinsam ist den Mediatoren Epac-1 und PKA die Eigenschaft die Kollagen- und DNA-Synthese von Fibroblasten zu inhibieren (Yokoyama *et al.* 2008). Jedoch weisen sie hinsichtlich ihrer Wirkung auf Fibroblasten auch signifikante Unterschiede auf. Während Epac-1 die Migration von Fibroblasten fördert und für ein rundes Aussehen der Zellen sorgt, hat die PKA eine Hemmung der Migration und eine sternenförmige Morphologie der Zellen zur Folge (Yokoyama *et al.* 2008). Die fibrosehemmende Eigenschaft von cAMP wurde bisher größtenteils in Versuchen demonstriert, in welchen ein cAMP-Anstieg mittels des AC-Aktivators Forskolin oder cAMP-

### 3. Einleitung

Analoga erzeugt wurde. Dagegen existieren nur wenige Daten über die rezeptorvermittelte cAMP-Generierung und ihre Auswirkung auf fibrotische Prozesse. Auch dem cGMP werden fibrosehemmende Effekte zugeschrieben. So konnte die TGF- $\beta_1$ -induzierte Myofibroblastentransformation und EZM-Synthese in kardialen Fibroblasten erfolgreich unterbunden werden (Li *et al.* 2008). Der entscheidende Mechanismus scheint dabei die Phosphorylierung des TGF- $\beta_1$ -Effektors Smad 3 durch die PKG zu sein.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die beiden sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP sowohl in Kardiomyozyten als auch Fibroblasten eine herausragende Stellung in der Signaltransduktion mit eindrucklichen Effekten hinsichtlich des Zellverhaltens und Auswirkung auf das gesamte Herz besitzen.



**Abbildung 3: Profibrotische und antifibrotische Faktoren.** Dargestellt ist eine vereinfachte Veranschaulichung von fibrosefördernden und -hemmenden Mechanismen im Herzen. Eine zentrale Schlüsselrolle in diesem Zusammenhang spielt das Zytokin TGF- $\beta_1$ , welches für diverse profibrotische Abläufe im Herzen verantwortlich ist. Am Ende dieser Abläufe steht die vermehrte Produktion der extrazellulären Matrix. Aufgeführt sind beispielhaft Faktoren einer vermehrten TGF- $\beta_1$ -Synthese. Eng verbunden mit der Präsenz von TGF- $\beta_1$  ist die  $\alpha$ -SMA-Expression, welche charakteristisch für Myofibroblasten ist. CTGF hingegen wird als Downstream-Mediator des TGF- $\beta_1$  gehandelt, da es mit vielen seiner profibrotischen Eigenschaften versehen ist. Dem gegenüber stehen die beiden wichtigen sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP, denen antifibrotische Merkmale attribuiert werden. Über ihre Mediatoren sind sie in der Lage die Kollagenproduktion zu verhindern. Dahinter verbergen sich komplizierte Mechanismen, die unter anderem die TGF- $\beta_1$ -induzierten Effekte antagonisieren.

#### 3.4.4 $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Fibroblasten

Die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Fibroblasten ist noch nicht so umfangreich untersucht wie in Kardiomyozyten. Erst aktuellere Forschungen legen den Fokus auch zunehmend auf die Prozesse in Fibroblasten, um die Physiologie des Herzens besser zu verstehen. So ist mittlerweile bekannt, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation in Fibroblasten die DNA- und die Kollagensynthese moduliert (Aránguiz-Urroz *et al.* 2011). Speziell cAMP kommt im Rahmen der Kollagenhomöostase eine zentrale Rolle zu. Eine  $\beta$ -adrenerg vermittelte Produktion von intrazellulärem cAMP bewirkt nach heutigen Erkenntnissen die Inhibition der Kollagensynthese, indem es einerseits die TGF- $\beta_1$ -vermittelte Phosphorylierung der ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) verhindert und andererseits die Smad-vermittelte Rekrutierung von transkriptionalen Coaktivatoren wie das *cAMP respond element-binding protein 1* (CREB-1) reduziert. Die Bindungsstellen am Smad-Komplex für CREB-1 werden dabei kompetitiv gehemmt. Dieser Vorgang geht auf die Phosphorylierung von CREB nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation zurück (Liu *et al.* 2006). So wird heute die gängige Meinung vertreten (Insel *et al.* 2012), dass erhöhte Spiegel von cAMP eine Konversion von Fibroblasten zu Myofibroblasten verhindern oder sogar rückgängig machen können, nachweisbar durch den Rückgang von CTGF, Kollagen und  $\alpha$ -SMA. Auch dem sekundären Botenstoff cGMP werden ähnliche antifibrotische Eigenschaften zugesprochen. Das cGMP übernimmt eine zentrale Rolle im Rahmen der Vasodilatation und stellt auch eine Schaltstelle antihypertropher Signalwege dar (Zhang und Kass 2011). Bekannt ist aber auch,

dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation eine Proliferation der kardialen Fibroblasten als Konsequenz hat (Leicht *et al.* 2000). So kommt es über die Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung des schon erwähnten Transkriptionsfaktors CREB. Dieser bindet anschließend an CRE, einem regulatorischen Element in einem Promotor von diversen Genen, und vermittelt auf diese Weise die Zellproliferation (Leicht *et al.* 2000). Man weiß aber auch, dass cAMP je nach Zelltyp ebenfalls proliferationshemmende Eigenschaften besitzen kann. Über einen längeren Zeitraum erhöhtes intrazelluläres cAMP drosselt die Zellproliferation kardialer Fibroblasten, die unter anderem durch Wachstumshormone wie PDGF (*platelet derived growth factor*) angestoßen wird (Marienfeld *et al.* 2001; Leicht *et al.* 2000).

### **3.5 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*)**

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften wie Größe, Struktur und Expressionsmuster näher typisieren. Dabei basiert die Durchflusszytometrie auf dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Das bedeutet, dass die in Suspension vorliegenden Zellen über eine dünne Kapillare mittels Druckluft angesaugt werden und dann in einem Flüssigkeitsstrom vorliegen. Dabei wird die Probe von einem Hüllstrom umgeben, der eine Bündelung und Verengung der Probenflüssigkeit zur Folge hat, sodass die Zellen hintereinander gereiht werden. Die Zellen werden in eine aus Quarzglas bestehende Messküvette befördert. Im weiteren Verlauf passiert jede einzelne Zelle einen vom Gerät ausgesandten fokussierten Laserstrahl. Am Kreuzpunkt von Laserstrahl und Flüssigkeitsstrom kommt es zu einer Streuung des Lichtes in zwei Richtungen sequenziell an jeder einzelnen Zelle. Anhand eben dieser Streuphänomene kann man auf Größe und Beschaffenheit der einzelnen Zellen schließen. Zum einen erfolgt eine Streuung des Lichtes entlang des eintreffenden Lichtstrahls in einem Ablenkungswinkel von  $0,5-2^\circ$ . Diese sogenannte Vorwärtslichtstreuung (*Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes und korreliert mit der Zellgröße. Zum anderen erfährt das Licht zusätzlich eine seitliche Streuung (*Sideward Scatter*) im rechten Winkel, die als Seitwärtslichtstreuung bezeichnet wird.

Sie steht für die Brechung des Lichtes und repräsentiert die Zellgranularität. Die Intensität des Lichtes wird in der Messkammer ermittelt und von Photodetektoren in einen elektrischen Impuls umgewandelt. Ein zusätzlicher zellulärer Parameter kann durch Bestimmung der Fluoreszenz ermittelt werden, welche Auskunft über Menge und Art von Oberflächenantigenen oder des Erbmaterials geben kann. Nur wenige Zellen sind dazu im Stande spontan ein Fluoreszenzsignal zu emittieren. Aus diesem Grund behandelt man die Zellen vorerst mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der an einen Antikörper gebunden ist und mit dem ganz spezifisch Oberflächenantigene aber auch intrazelluläre Antigene markiert werden können. Außerdem kommen noch weitere Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. DAPI zur Anwendung, die in der Lage sind sich an die DNA anzuhängen. Aufgrund dieser Eigenschaften der Farbstoffe kann man zusätzlich noch Aussagen über die Zellzyklusphasen treffen. Durch Einsatz der Farbstoffe erfolgt eine Absorption von Lichtenergie in einem für den Farbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Unterscheidung mehrerer Antigen-Antikörper-Komplexe während einer Messung ist durch Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gewährleistet, da diese unterschiedliche Emissionsspektren haben. Moderne FACS-Geräte verfügen über mehrere Laser, Filter und Photodetektoren, so dass die unterschiedlichen Wellenlängen erfasst werden können.

### **3.6 Zielsetzung**

In der Forschung wurden bereits viele Anstrengungen unternommen die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bezüglich der Kardiomyozyten näher zu durchleuchten. In diesem Zusammenhang wurden die Fibroblasten eher vernachlässigt. Erst durch aktuellere Veröffentlichungen wird deutlich, dass sich auch ein Blick auf diese Zellen lohnen kann, um das Feld der Therapiemöglichkeiten zu erweitern. Trotz der tragenden Rolle von cAMP in der Aktivierung antifibrotischer Signalwege war bisher wenig bekannt über die zellulären Auswirkungen einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation – eine typische Erscheinung bei Herzinsuffizienz – auf Fibroblasten. Genau dieser Aspekt sollte in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen werden. So sollte unter anderem



durch Ermittlung von profibrotischen Parametern wie  $\alpha$ -SMA und CTGF untersucht werden, ob die chronische Stimulation möglicherweise einen Einfluss auf den Phänotyp und die Aktivität der Fibroblasten hat. Bisher gab es auch keine Untersuchungen hinsichtlich der Rolle des  $\beta$ -adrenergen Verstärkers I-1 in Fibroblasten. Aus diesem Grund sollte der I-1 in Fibroblasten *in vitro* überexprimiert werden, um anschließend mögliche Veränderungen im Phänotyp oder in der Aktivität der Zellen ausfindig zu machen. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die molekularen Konsequenzen einer I-1-Modulation zu erforschen und zu untersuchen, ob der I-1 in seiner Rolle als Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade Auswirkungen auf fibrotische Prozesse im Herzen hat.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Tiere

Wistar-Kyoto-Ratten, Herkunft: Charles River, Sulzfeld

Die Tiere wurden in der Forschungseinrichtung der Universität Göttingen unter standardisierten und konventionellen Bedingungen gehalten. Die Standardkäfige wurden in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 19-21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-55% untergebracht. Die Tiere waren dabei einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus mit 12 h Lichtexposition und 12 h Dunkelheit ausgesetzt. Wasser und Qualitätsfutter wurde den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Haltung und Pflege der Tiere wurde unter Einhaltung des deutschen Tierschutzrechts, den Tierschutzbestimmungen des Landes Niedersachsen und der NIH-Richtlinien (National Institutes of Health, Bethesda, USA) durchgeführt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1.2 Antikörper

#### Antikörper für Immunoblot

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verd. 1. AK</b>	<b>Inkubationsbedingungen</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>CTGF</b> (L20), polyklonal, Santa Cruz, sc-14939	1:200	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in TBS-T	<b>Anti-g-IgG-HRPO</b> , 1:10000
<b>Phospho-CREB</b> , monoklonal, Cell Signaling, 9196	1:1000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> , 1:2000
<b>α-Glattmuskelaktin</b> , monoklonal, Sigma-Aldrich, A5228	1:2000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-m-IgG-POX</b> , 1:20000
<b>GAPDH</b> (G-9), monoklonal, Santa Cruz, sc-365062	1:1000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in TBS-T	<b>Anti-m-IgG-POX</b> , 1:10000
<b>GAPDH</b> (6C5), monoklonal, Santa Cruz, sc-32233	1:500	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in TBS-T	<b>Anti-m-IgG-POX</b> , 1:20000
<b>Prokollagen 1A1</b> (M-60), polyklonal, Santa Cruz, sc-30136	1:2000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> , 1:5000
<b>PhosphoDARPP-32</b> , polyklonal, Cell Signaling, 2302	1:1000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> (high), 1:10000
<b>Vimentin</b> , monoklonal, abcam, ab20346	1:1000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> , 1:5000
<b>α-actinin</b> , monoklonal, Sigma-Aldrich, A5044	1:1000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-m-IgG-POX</b> , 1:10000
<b>I-1</b> , polyklonal, El-Armouche <i>et al.</i> 2003	1:2000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> , 1:5000
<b>eGFP</b> , polyklonal, Cell Signaling, 2555	1:2000	ü.N, 4 °C oder 2 h bei RT in 5%iger Michpulverlösung	<b>Anti-r-IgG-POX</b> , 1:5000

**Tabelle 1:** Primärantikörper Western Blot

#### 4. Material und Methoden

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubation</b>
<b>Anti-Ziege-IgG-HRP-Konjugat</b> (Esel), Santa Cruz, sc-2020	1:5000-1:10000	45 min bei RT in 5%iger Milchpulverlösung
<b>Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat</b> (Ziege), Sigma Aldrich, A3682	1:10000-1:20000	45 min bei RT in 5%iger Milchpulverlösung
<b>Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat</b> ( <i>low</i> , Ziege), Sigma-Aldrich, A0545	1:2000-1:5000	45 min bei RT in 5%iger Milchpulverlösung
<b>Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat</b> ( <i>high</i> ), Jackson Immuno-Research, 111-035-045	1:10000-1:20000	45 min bei RT in 5%iger Milchpulverlösung

**Tabelle 2:** Sekundärantikörper Western Blot

#### Antikörper für FACS-Analyse

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>α-Glattmuskelaktin</b> , monoklonal, Sigma-Aldrich	1:5000-1:10000	<b>anti-m-IgG</b> , 1:10000
<b>IgG1</b> (MAB002), Control R&D Systems	1:100	<b>anti-m-IgG</b> , 1:10000
<b>Kollagen 1A1</b> , polyklonal, abcam	1:500	<b>anti-m-IgG</b> , 1:10000

**Tabelle 3:** Primärantikörper Durchflusszytometrie

Als Sekundärantikörper für α-Glattmuskelaktin, Prokollagen und die Isotypenkontrolle mit IgG wurde Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) der Firma Lifetechnologies in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Antikörper für Immunfluoreszenz

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>α-Glattmuskelaktin</b> , monoklonal, Sigma-Aldrich	1:2000	<b>anti-m-IgG</b> 1:500
<b>CTGF</b> , polyklonal, Santa Cruz	1:50-1:500	<b>anti-m-IgG</b> 1:500

**Tabelle 4:** Primärantikörper Immunfluoreszenz

Als Sekundärantikörper zur Darstellung von α-Glattmuskelaktin und CTGF wurde jeweils Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) der Firma Lifetechnologies in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

**4.1.3 Geräte**

**Gerätebezeichnung**

**Hersteller**

Analytikwaage

Sartorius AG

Akkupipette *Pipet-Aid*®

Drummond Scientific  
Company

*BioPhotometer 6131*

Eppendorf

Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter

Sarstedt

Chemie-Pumpstand *PC 500 Lan NT*

vacuubrand

Digitalkamera am Fluoreszenzmikroskop

Zeiss

*AxioCam MRM*

Digitalwaage *ED153*

Sartorius AG

Durchlichtmikroskop *Axivert S100 TV*

Zeiss

Elektrophorese-Spannungsgerät *PowerPac Basic*

Bio-Rad

Elektrophoresesystem

Bio-Rad

(*Mini Protean*® *electrophoresis cell*)

#### 4. Material und Methoden

---

FACS-Messgerät <i>BD LSR II Flow Cytometer</i>	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert 200</i>	Zeiss
Kippwippe <i>Rocking Platform WT15</i>	Biometra
Inverses Fluoreszenzmikroskop <i>IX81-ZDC</i>	Olympus
<i>Mr. Frosty™-Nalgene®</i>	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge <i>Megafuge 3.0 R</i>	Heraeus
Magnetrührer <i>Ikamag® Reo</i>	Ika
Mikroplattenleser <i>FlexStation 3</i>	Molecular Device
<i>Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging System</i>	Bio-Rad
<i>Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 Imaging System</i>	Bio-Rad
Plattformschüttler <i>Titramax 100</i>	Heidolph
pH Meter <i>pH Level 1</i>	inoLab
Spectrophotometer <i>NanoDrop 1000</i>	Thermo Scientific
Sterile Werkbank <i>Safe 2020 Class II Biological</i>	Thermo Scientific
Sterile Werkbank <i>SterilGARD Hood Class II</i>	The Baker Company
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Wärmeschüttler <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf
Wippender Plattformschüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph
Virusinkubator <i>Forma® Series II Water Jacketed</i>	Thermo Scientific
Zählkammer, <i>Neubauer-improved</i>	Laboroptik
Zellinkubator <i>Steri-Cult 200 Incubator</i>	Forma Scientific

### 4.1.4 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Chromatographiepapier ( <i>Whatman 3 MM</i> )	GE Healthcare
Deckgläser, 24x60 mm	Marienfeld
Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml	B. Braun
Gewebekulturplatten, 6-Well, 12-Well	Nunc
Handschuhe	Meditrade
Kryogefäße	Nunc
Küvetten (10 x 4 x 45)	Sarstedt
<i>Multiplex Pipette Tips</i> , 0,5-200µl	peqlab
Messküvetten	Sarstedt
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
<i>Protran</i> <sup>®</sup> Nitrocellulosemembran	Whatman
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Sammelgefäße, 15 ml, 50 ml	Greiner-Bio-One
<i>SuperFrost</i> <sup>®</sup> Objektträger	Gerhard Menzel GmbH
Zellkulturschalen, 10 cm, 15 cm	Sarstedt
Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

#### 4.1.5 Feinchemikalien und Zellkultursubstanzen

<b>Name</b>	<b>Hersteller, Artikelnr.</b>
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (37, 5:1)	AppliChem, 3029.1
Ammoniumpersulfat (10%)	Bio-Rad, #161-0700
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun
Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)	Bachem, H-2095.1000
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, B8026
CGP 20712	Tocris, #1024
<i>complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche, 04693159001
Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, D9542
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, 4984
DMEM, 1g/l Glukose mit Pyruvat	Gibco, 21885
DMEM, 4,5 g/l Glukose	Gibco, 61965
1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, A1101
DNase I, <i>Bovine Pancreas</i>	Calbiochem
<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Pierce, 32106
Ethanol absolut	J.T. Baker, 8025.0250
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, A0883
Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-	AppliChem, A0878
N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, 10270
<i>Fluoromount-G™</i>	SouthernBiotech, 0100-01
Glucose	AppliChem, A0883
Glycerol	AppliChem, A0970
HEPES	Roth, HN77.4

#### 4. Material und Methoden

---

Salzsäure (HCl)	AppliChem, A0659
ICI 118,551	Tocris, #0821
<i>IgG from bovine serum</i>	Sigma-Aldrich, I9640
Isoprenalin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, I5627
Isopropanol	Merck, 109634
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, P018.2
L-Glutamin	Gibco, 25030-081
Magermilchpulver	AppliChem, A0830
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem, A4425
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Merck, A171286
MEM, NEAA	Gibco, 11140
Mercaptoethanol	AppliChem, A4338
Methanol	Roth, 8388.6
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, 822335
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, 3957
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, 6346
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, A2572
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, 6771.1
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, P6148
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Gibco, 14190
<i>Pen-Strep</i> , 100 x	Gibco , 15140
Phalloidin-633	Invitrogen, A22284
<i>Phosphostop</i> -Tablette	Roche, 04906845001
Polyoxyethylene (29) sorbitan monolaurate ( <i>Tween</i> <sup>®</sup> 20)	Sigma-Aldrich, T8787
Ponceau S-Lösung	AppliChem, A1405
<i>Precision Plus Standard</i> <sup>™</sup> , <i>All Blue</i>	Bio-Rad, #1610373



## 4. Material und Methoden

---

Rinder-Immunglobulin G	Sigma-Aldrich, I5506
Roti®-Histofix 4%	Roth, P087.4
Roti®-Nanoquant (5x Konzentrat)	Roth, K880.1
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	AppliChem, A0416
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific, 10220294
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, #161-0801
Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, P088
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, A1086
Triton X-100	Roth, T8787
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, T8154
Trypsin 250	Difco, 215240
Trypsin-EDTA	Gibco, 25200
Ziegenserum	Sigma-Aldrich

### 4.1.6 Puffer, Nährmedien und Lösungen

Puffer für proteinbiochemische Methoden

RIPA-Puffer ( <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i> )	15,7 mM Tris-HCL ph 7,5
	58,4 mM NaCl
	1% Triton-X 100
	0,1% SDS
	1 mM EDTA
	+ eine Protease-Inhibitor Tablette von Roche ( <i>Phosphostop</i> )

#### 4. Material und Methoden

---

10x Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% SDS
5x Transferpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% SDS
Ansatz 1x Transferpuffer	20% 5x Transferpuffer 20% Methanol 60% Milipore-Wasser
10x TBS-Puffer	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl pH 7,5
TBS-T-Puffer	10% 10x TBS-Puffer 0,1% Tween 20
Stripp-Puffer	62,5 mM Tris 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 2% SDS
6x SDS-Page Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	40 mM Tris-HCl 2% SDS 0,01% Bromphenolblau

#### 4. Material und Methoden

---

	10% Glycerol
	100 mM DDT
	pH 6,8
Ponceau S-Lösung	0,2% Ponceau-S
	3% Trichloressigsäure
	3% 5-Sulfosalicylsäure
Wachstumsmedium	DMEM, 4,5 g/l Glukose
	10% FCS
	1% Penicillin/Streptomycin
	1% NEAA
Interventionsmedium/Hungermedium	DMEM, 1,5 g/l Glukose mit Pyruvat
	1% Penicillin/Streptomycin
Transduktionsmedium	DMEM, 4,5 g/l Glukose
	1% Penicillin/Streptomycin
Einfrriermedium für eukaryotische Zellen	70% Wachstumsmedium
	20% FCS
	10% DMSO
Puffer und Lösung zur Isolierung von Primärzellen	
DNAse-Lösung	0,004 mg/ml DNAse
	3,4% FCS

#### 4. Material und Methoden

---

	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	in CBFHH-Puffer
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM)	DMEM
	10% FCS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
Trypsin-Lösung	2,6 mg/ml Trypsin
	0,004 mg/ml DNase
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	in CBFHH-Puffer
Präparationspuffer (CBFHH)	140 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	0,8 mM MgSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O
	0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,34 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O
	5,6 mM Glukose
	16,8 mM HEPES/NaOH pH 7,4
	→ sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C
Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz	
Blockpuffer	100 mM Tris-HCl pH 7,5

## 4. Material und Methoden

---

	150 mM NaCl
	0,2% Triton X-100
	1% BSA
	5% Ziegenserum
Antikörper-Lösungspuffer	100 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,5% Triton X-100
	1% BSA
	0,1 mM EGTA
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer für FACS-Messung	
Blockpuffer	PBS, Gibco
	1% BSA
	0,5% Triton X-100
	5% Ziegenserum

### 4.1.7 Adenoviren

Ad-eGFP: Dieser Vektor kodiert für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* unter Kontrolle des CMV-Promotors. Dieses emittiert grünes Licht bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (475 nm), was unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Die im Folgenden aufgelisteten I-1-Mutanten exprimieren ebenfalls dieses Gen. Aus diesem Grund wurde in jedem Versuchsansatz eine mit eGFP-transduzierte Negativkontrolle mitgeführt.

**Ad-I-1WT:** Dieser Vektor exprimiert den Wildtypen des I-1. Dieser lässt sich sowohl an der Stelle T35 als auch S67 phosphorylieren.

**Ad-I-1S67A:** Bei dieser Mutante wurde ein Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin vorgenommen, sodass eine Phosphorylierung an dieser Stelle nicht mehr möglich ist und eine Aktivitätsminderung durch die PKC $\alpha$  ausgeschlossen ist. Die Generierung erfolgte ausgehend vom Wildtyp I-1 durch einen Basenaustausch von Threonin zu Guanin auf RNA-Ebene, die in dem genannten Aminosäureaustausch auf Proteinebene resultierte.

Alle verwendeten rekombinanten Adenoviren stammen aus den Laborbeständen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Ali El-Armouche und wurden von Dr. Katrin Wittköpfer (Ad-eGFP, Ad-I-1WT, Ad-I-1S67A) hergestellt bzw. Dr. Simon Lämmle (Ad-eGFP) amplifiziert. Näheres zu den verwendeten I-1-Mutanten ist in der Dissertation von Dr. Katrin Wittköpfer nachzulesen (Generierung und kardiale Genotypisierung von Mäusen, die phosphomutierte Formen des Phosphatase-Inhibitor-1 herzspezifisch und konditional überexprimieren, 2009).

Die Transduktion mit Adenoviren wurde regelmäßig fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Die verwendeten Viren kodieren alle für das *Enhanced Green Fluorescent Protein*, was durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 509 nm Fluoreszenzlicht emittiert. Diese Emission von Licht kann unter einem Fluoreszenzmikroskop erfasst werden. Zu diesem Zweck kam das Fluoreszenzmikroskop *Axiocvert 200* von Zeiss zum Einsatz. Mit der Software *Visiview* konnten die Einstellungen wie beispielsweise die Dauer der Belichtungszeit festgelegt und die Aufnahmen digital nachbearbeitet werden. Das Mikroskop ist über einen Adapter an eine Digitalkamera (*Axiocam MRM*) angeschlossen. Durch Verwendung von entsprechenden Filterblöcken am Mikroskop konnte sichergestellt werden, dass nur das abgestrahlte Licht beobachtet wird. Für den Farbstoff eGFP bedarf es eines Anregungsfilters für den Wellenlängenbereich  $470 \pm 20$  nm und eines Emissionsfilters für den Bereich  $522 \pm 20$  nm. Der Teilerspiegel sollte so eingestellt sein, dass Licht der Wellenlänge 497 nm passieren kann. Es wurden standardmäßig Aufnahmen in 5x und 10x Vergrößerung gemacht.

### 4.1.8 Verwendete Software

Die Darstellung und Bearbeitung der Immunoblots nach Detektion im *Versa Doc* konnte mit dem Programm *Quantity One* vorgenommen werden. Das FACS-Gerät *BD LSR II Flow Cytometer* konnte über die Software *FACS DIVA* bedient und eingestellt werden. Diese bietet auch die Möglichkeit die Ergebnisse wie üblich als *Dot-Plot* oder Histogramm abzubilden. Die Auswertung der photometrischen cAMP-Messung am *microplate reader* erfolgte mit dem Programm *Softmax Pro*. Die Einstellungen für die Fluoreszenzmikroskopie am *Axiovert 200* und der damit verbundenen Digitalkamera konnten über das Programm *Visiview* festgesetzt werden. Die Bilder am inversen Fluoreszenzmikroskop *IX81-ZDC* wurden mit der Software *ExcellencePro* aufgezeichnet und bearbeitet. Die Auswertung der ermittelten Daten wurde stets mit Hilfe der Software *Microsoft Excel* durchgeführt.

### 4.1.9 Statistische Auswertung

Aus den Einzelwerten wurde statistisch der arithmetische Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) unter Benutzung der Tabellenkalkulationssoftware *Microsoft Excel* ermittelt. Weiterhin von Bedeutung war die Berechnung der statistischen Varianz und der Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests nach Student bestimmt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt wurde. Mit dem Programm *Graph Pad Prism* konnten die errechneten Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen dargestellt werden.

## 4.2 Präparation und Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten

### 4.2.1 Gewinnung von neonatalen Rattenkardiomyozyten und Fibroblasten

Für die Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten und Fibroblasten wurden ca. 1-3 Tage alte Ratten über die Zentrale Tiereinheit (ZTE)/Göttingen bereitgestellt. Die unten angegebenen Volumina sind für eine Präparation von ca. 30 Rattenherzen berechnet. Nach Dekaptierung der Tiere erfolgte mittels thorakaler Inzision die

Eröffnung des Brustkorbs. Durch leichte thorakale Massage trat das Herz an der oberen Thoraxapertur hervor und konnte entnommen werden. Die Herzen wurden vollständig mit Gefäßstümpfen entfernt und unmittelbar danach in Zellkulturschalen mit eiskaltem Präparationspuffer (CBFHH-Puffer = *Calcium and Bicarbonate free Hanks with HEPES*, 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,6 mM Glukose, 16,8 mM HEPES, pH 7,4, sterilfiltriert) gesammelt. Die nächsten Schritte wurden auf Eis fortgesetzt. Zunächst wurden die Ventrikel von den Vorhöfen und Gefäßstümpfen getrennt. Anschließend wurde das verbliebene kardiale Gewebe in zwei Hälften geschnitten und in eine weitere Zellkulturschale mit 20 ml CBFFH-Puffer überführt. Nach einmaligem Waschen mit je 20 ml desselben Mediums wurde das Gewebe mittels Rasierklingen oder Scheren in ca. 1-mm<sup>3</sup>-Stücke zerkleinert. Nach Hinzugeben von 2 ml CBFFH-Puffer wurden die Gewebestücke in ein 50-ml-Falcon-Reaktionsgefäß transferiert. Nach Absetzen des Gewebes auf den Boden des Reaktionsgefäßes wurde der Überstand verworfen und die verbleibende Gewebesuspension zweimal mit 20 ml CBFFH-Puffer gewaschen.

Als erstes gab man 8 ml der Trypsin-Lösung (2,6 mg/ml Trypsin, 0,004 mg/ml DNase, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, in CBFHH-Puffer) zum Sediment und ließ die Verdauung für 10 min bei Zimmertemperatur auf einem Kippschüttler voranschreiten. Nach Sedimentation wurde der Überstand verworfen und der Vorverdau mit 8-ml-Trypsin-Lösung wiederholt mit dem Unterschied, dass der Überstand ohne Mitnahme von Gewebestücken in ein mit 2,5 ml Kälberserum vorgelegtem Sammelröhrchen überführt wurde. Im Anschluss wurde das Gewebe mit 7 oder 8 ml einer DNase-Lösung (100 U/ml Penicillin, 100 µl/ml Streptomycin, 3,4% FCS, 0,004 mg/ml DNase, in CBFHH) versetzt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 20-25-mal) wurde eine Durchmischung der Gewebesuspension sichergestellt. Die Überstände wurden in einem Falcon-Reaktionsgefäß gesammelt. Daran anknüpfend wurde das kardiale Gewebe mehrmals einem erneuten Verdauungszyklus bis zur vollständigen Auflösung ausgesetzt unter sukzessiver Verringerung der Trypsin- und DNase-Lösung um 0,5 ml und der Inkubationszeiten um 1 min nach jedem Schritt.



Die Sammelröhrchen wurden für 15 min bei 4 °C und 60 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5804 R*). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet jeweils in 2-ml-Nicht-Kardiomyozyten-Medium (DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) aufgenommen. Der Inhalt der Sammelröhrchen wurde im Anschluss vereinigt und noch zusätzlich jeweils mit 2 ml Medium gespült. Im Folgenden wurden auf 30-ml-Zellsuspension 250 µl des DNase1-Stocks (1 mg/ml) hinzupipettiert. Der Inhalt des Sammelröhrchens wurde nun gründlich durchmischt und anschließend ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 60 g angefügt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in frischem Nicht-Kardiomyozyten-Medium resuspendiert.

Als nächstes wurde ein Zellfilter mit einer Maschenweite von 250 µm mit 2-3 ml des Nicht-Kardiomyozyten-Mediums benetzt, um anschließend die Zellsuspension in eine sterile Zellkulturschale zu filtrieren und dann in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Um eine Zellzählung vorzunehmen, wurden die Zellen mittels Trypanblau angefärbt, wobei jeweils 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0,5% Trypanblau in PBS) versetzt wurden. Hiervon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer (*Neubauer-improved*) pipettiert

Die Zellen wurden in eine mit 15 bis 20 ml Medium vorgelegte 15 cm große Zellkulturschale ausgesät und diese anschließend in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C unter 100% Luftfeuchtigkeit für 60 bis 90 min inkubiert. In dieser Zeit adhäreren die Fibroblasten auf dem Schalenboden, während die Kardiomyozyten in Suspension bleiben und die beiden Zelltypen können voneinander selektiert werden.

### **4.2.2 Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten**

Im direkten Anschluss an die Selektion wurden die Zellen mit einem speziellen Fibroblastenmedium (DMEM 4,5 g/l Glukose, 10% FCS, 1% MEM NEAA, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) versorgt. Im Vorfeld des Mediumwechsels mussten zunächst die Komponenten des Mediums im Wärmebad auf 37 °C erwärmt werden. Die Zellsuspension mit den Kardiomyozyten in den 15-cm-Zellkulturschalen wurde dann abgenommen und je nach Versuchsaufbau weiterwendet. Durch leichtes Schlagen der

Schalen auf den Boden konnten auch die am Grund haftenden Kardiomyozyten gelöst werden. Im weiteren Verlauf wurden die Schalen noch zweimal mit 10 ml Calcium- und Magnesiumfreiem-PBS gewaschen. Daran anknüpfend wurden die Schalen mit etwa 15 ml Medium benetzt und im Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Adhäsion und das Wachstumsverhalten der Fibroblasten wurden regelmäßig lichtmikroskopisch (*Axivert S100 TV*) kontrolliert. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel bis zum Stadium der 90%igen Konfluenz durchgeführt. In der Regel konnte nach zwei Tagen ein konfluenter Zellrasen lichtmikroskopisch beobachtet werden. Für die Passagierung der Fibroblasten wurden die Zellkulturschalen vorerst nach Absaugen des alten Mediums mit PBS gespült und mit 8 ml 0,25%-Trypsin für 6 min im Brutschrank bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Trypsin bewirkt sowohl eine Ablösung der Fibroblasten vom Boden als auch eine Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen. Anschließend wurde die Trypsin-Einwirkung durch Zugabe der doppelten Menge Medium gestoppt. Durch vorsichtiges Klopfen auf den Boden konnte die Ablösung der Fibroblasten vom Schalengrund vorangetrieben werden. Als nächstes wurde die Suspension in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt und dieses dann für 5 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5804 R*). Das Zellpellet wurde daraufhin mit 18 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun je nach Versuchsanordnung auf mit 2 ml Medium vorgelegte 6-Well-Platten aufgeteilt werden. Die Zellsuspension aus einer 15-cm-Zellkulturschale wurde in der Regel auf insgesamt drei 6-Well-Platten in einer Ratio von 1:1 gesplittet. Die folgenden Versuche wie zum Beispiel die Stimulation oder Transformation der Fibroblasten wurden mit 6-Well-Platten bei einer Konfluenz von 80% durchgeführt. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Fibroblasten war dabei vom Aussaat-Verhältnis und vom Alter der Zellen abhängig. Im Falle weiterer Passagierungen der Primärzellen wurden die Fibroblasten in einem Zwischenschritt von den 15-cm-Schalen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 auf 10-cm-Schalen gesplittet bevor eine endgültige Aufteilung auf die 6-Well-Platten erfolgte. Für die Versuche kamen sowohl Zellen der Passage 1 als auch der Passage 2 zum Einsatz.

Die verwendeten Mengen für Trypsin und Medium unterscheiden sich je nach Größe der Zellkulturschalen. Im Folgenden sind genaue Angaben hierzu aufgelistet.

## 4. Material und Methoden

	Zellzahl bei Konfluenz	Trypsin 0,05%	Medium
10-cm-Schale (Sarstedt)	$8,8 \times 10^6$	3 ml	10 ml
15-cm-Schale (Sarstedt)	$20 \times 10^6$	8 ml	20 ml
6-Well-Platte (Nunc)	$1,2 \times 10^6$	2 ml	3-5 ml

**Tabelle 5:** Zellkulturschalen

### 4.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Fibroblasten konnten zum Zwecke der langfristigen Aufbewahrung mithilfe eines eigens hergestellten Einfriermediums bei  $-80\text{ °C}$  tiefgefroren werden. Das Einfriermedium wurde zusammengestellt aus 70% Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO, wobei letzteres die kryoprotektive Hauptkomponente darstellt und für den strukturerhaltenden Effekt verantwortlich ist. Ähnlich wie bei der Passagierung wurden auch hier die Zellen bei Erreichen der Konfluenz zunächst trypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in das besagte Einfriermedium aufgenommen und in dafür vorgesehene vorgekühlte Kryogefäße (Nunc) transferiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Einfriermodul (*Mr.Frosty*-Nalgene) bei  $-80\text{ °C}$  unter gleichmäßiger Abkühlung von  $1\text{ °C/min}$  eingefroren. Auf diese Weise konnten in einem Röhrchen etwa 200000 Zellen dauerhaft kryokonserviert werden.

Um die kryokonservierten Zellen erneut in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen zunächst zügig in einem  $37\text{ °C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und die Fibroblasten möglichst schnell in Kulturmedium aufgenommen.

### 4.3 Pharmakologische Intervention

Für die Stimulationsversuche kamen Fibroblasten der ersten oder zweiten Passage zum Einsatz. Die Versuchsanordnung war so konzipiert, dass jeweils die Hälfte der Wells eines Ansatzes mit Isoprenalin behandelt und die andere Hälfte unbehandelt als Kontrolle dem gegenübergestellt wurde. Das Isoprenalin wurde in jedem Well in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{mol}$  eingesetzt. Es wurde sowohl eine akute Stimulation von 10 min als auch eine chronische Stimulation für 24 h vorgenommen. Dazu wurde vor der Intervention ein Mediumwechsel von Medium mit 4,5 g/l Glukose auf ein niederglukosiges Medium (1 g/l) mit Pyruvat durchgeführt, nachdem die Zellen zweimal mit frischem Medium gewaschen wurden. Dem neuen Medium wurden noch 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt, jedoch im Gegensatz zum Vollmedium FCS und nicht essentielle Aminosäuren entzogen. Durch Weglassen des FCS wird der unspezifische Einfluss durch Wachstumsfaktoren ausgeschaltet. Zur gleichmäßigen Verteilung der Wirksubstanz wurden die 6-Well-Platten vorsichtig hin und her bewegt. Bei der akuten Stimulation wurden die Platten nach Isoprenalingabe im Brutschrank bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> für 10 min inkubiert und anschließend wurde die Zellernte durchgeführt. Um bei der chronischen Stimulation möglichst konstante Wirkspiegel zu erreichen, fand die Lösung von Isoprenalin in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{mol}$  insgesamt pro Ansatz zweimal im Abstand von 12 h statt. Zwischen den Gaben wurden die Platten in dem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Zellernte durchgeführt.

### 4.4 Adenovirale Transduktion der Fibroblasten

Die adenovirale Transduktion wurde bei einer Konfluenz von 80% in den 6-Well-Platten begonnen. Vor der Transduktion wurde ein Wechsel auf ein serumfreies Medium mit 4,5 g/l Glukose und 1% Penicillin/Streptomycin ohne Zugabe von Nicht-essentiellen-Aminosäuren vorgenommen. Um die Kultur gänzlich vom Vollmedium zu befreien, wurden die einzelnen Wells zunächst zwei Mal mit dem neuen Medium gewaschen. Anschließend konnten die Viruslösungen dem Medium zugesetzt werden. Die Zelllinien wurden dabei mit einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 300 transduziert und das

benötigte Volumen nach der Formel  $V = \text{MOI} \times \text{Zellzahl}$  in einem Well/Virustiter berechnet. Bei einer Konfluenz von 80% ergab sich eine Zellzahl von 1 Million zu transduzierender Fibroblasten. Die optimale MOI zur Transduktion der Fibroblasten wurde für alle verwendeten Viren zuvor schon in der Arbeitsgruppe El-Armouche durch Herstellung einer Verdünnungsreihe ermittelt. Die MOI beschreibt das Verhältnis von den infektiösen Agenzien zu deren Zielzellen (Zahl der Viren/Zahl der Zellen). Durch Hin- und Herschwenken der 6-Well-Platten erfolgte eine gleichmäßige Verteilung der Viruslösung. Anschließend wurden die Zellen für etwa 3 h mit dem Virus bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit Interventionsmedium (1 g/l Glukose) wurden die Zellen für weitere 24 h mit frischem Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Je nach verwendetem Virus gab es Variationen in der Inkubationszeit bis eine zufriedenstellende Transduktion erreicht wurde. Die Transduktionseffizienz wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (*Axiovert 200*, Zeiss) nach 12 h, 24 h und eventuell auch nach 36 h kontrolliert, da alle verwendeten Viren zusätzlich für das verstärkte, grün-fluoreszierende Protein eGFP kodierten. Die Fluoreszenz wurde mit einer Digitalkamera (*AxioCam MRM*, Zeiss) dokumentiert.

Die adenovirale Transduktion erfolgte in zwei verschiedenen Versuchen. Um den Einfluss des I-1 auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade näher zu durchleuchten, wurden die Fibroblasten nach Überexpression der Serin-67-Alanin-Mutante (S67A) sowohl akut als auch chronisch mit Isoprenalin behandelt analog zu den vorher beschriebenen Versuchen ohne Virustransduktion. Als Kontrolle wurden mit Ad-eGFP-Viren transduzierte Fibroblasten, die ebenfalls in zwei Gruppen hinsichtlich erfolgter und nicht erfolgter Isoprenalinbehandlung eingeteilt wurden, hinzugezogen. So wurden mögliche durch das eGFP hervorgerufene Effekte ausgeschlossen. Die Inkubationszeit nach Entfernen des Virusmediums betrug für die verwendeten Adenoviren 36 h. Erst dann konnte eine ausreichende Fluoreszenz für beide Transduktionen detektiert werden. Anschließend wurde mit der Isoprenalinstimulation begonnen.

Für die Rezeptortypisierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in Fibroblasten kam das Ad-I-1-Wildtyp zum Einsatz. Nach der adenoviralen Transduktion wurden die Zellen in aufsteigender Konzentration mit einem  $\beta_1$ -Rezeptorblocker bzw. einem  $\beta_2$ -Rezeptorblocker bei gleichzeitiger Gabe von 1  $\mu\text{mol}$  Isoprenalin für insgesamt

10 min behandelt. Während der Inkubationszeit wurden die 6-Well-Platten in den Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt.

### **4.5 cAMP-Konzentrationsbestimmung in kardialen Fibroblasten**

Die Fibroblasten wurden unter üblichen Bedingungen auf 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Aufarbeitung der Zellen und die Messung der intrazellulären cAMP-Akkumulation wurde mit dem cAMP-Immunoassay (*Parameter™ cAMP Assay*) der Firma R&D Systems gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und fußt auf dem Prinzip eines kompetitiven Assays. Dabei konkurriert das cAMP aus dem Zelllysate mit dem cAMP-Konjugat um die Bindungsstellen am polyklonalen Primärantikörper am Boden der Vertiefungen der mitgelieferten 96-Well-Mikrotiterplatte. Je mehr cAMP im Zelllysate enthalten ist, desto weniger Bindungsstellen bleiben für das cAMP-Konjugat frei. Durch Hinzugeben der Substratlösung kommt es in Anwesenheit des cAMP-Konjugates zu einer enzymatischen Reaktion, die einen Farbwechsel zur Folge hat. Die Substratlösung enthält die Substanz Paranitrophenylphosphat, die durch das mit alkalischer Phosphatase markierte cAMP in Paranitrophenol und Phosphat gespalten wird. Dadurch wird eine Farbveränderung zu blau hervorgerufen, deren Intensität photometrisch als Absorptionsmessung erfasst wird und sich indirekt proportional zum endogenen cAMP verhält. Das bedeutet, dass die Proben mit dem meisten cAMP-Gehalt die geringste Farbänderung zeigen. Die Messung erfolgte dabei an einem *FlexStation 3*-Mikroplattenleser. Um quantitative Aussagen über die cAMP-Konzentrationen treffen zu können, musste zusätzlich eine Standardkurve anhand der Absorptionswerte von cAMP-Standardproben erstellt werden. Die Daten wurden mit Hilfe der *Soft Max Pro 5.4*-Software dargestellt und mit *MS Excel* ausgewertet.

### 4.6 Durchflusszytometrie

#### 4.6.1 Vorbereitung der Fibroblasten für die Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden unter bereits beschriebenen Standardbedingungen auf 6-Well-Platten ausgesät und in Kultur gehalten. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen zweimal mit 4 °C kaltem PBS gespült und anschließend abtrypsiniert. Die Zellsuspension wurde dann jeweils in ein 15-ml-Röhrchen transferiert und bei 4 °C und 1500 g für 5 min zentrifugiert (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5804 R*, Eppendorf). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 °C kaltem PBS resuspendiert, um dann mit einem erneuten Zentrifugationsschritt fortzufahren. Diesmal wurde das Zellpellet in 3 ml 70%igem Ethanol resuspendiert. Danach wurde die Probe direkt mittels Antikörpern auf das Oberflächenantigen  $\alpha$ -SMA gefärbt oder bei 4 °C gelagert. In beiden Fällen musste zunächst das Ethanol nach Zentrifugation bei 4 °C und 300 g für 4 min abgesaugt und das Zellpellet in 4 °C vorgekühltem Block-Puffer (800  $\mu$ l pro Falcon-Reaktionsgefäß) resuspendiert werden. Der Block-Puffer (PBS, 0,5% Triton X-100, 1% BSA, 5% Ziegenserum) dient dazu um im weiteren Verlauf unspezifische Antikörperbindungen durch Blockierung der Oberflächenantigene zu verhindern. Die Vertiefungen einer für den Färbungsprozess vorgesehenen 96-Well-Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 200  $\mu$ l der Proben nach zuvor erstelltem Pipettierschema beladen. Im Folgenden wurde die gesamte Platte bei 4 °C und 300 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörper wurden mit Block-Puffer in gewünschter Konzentration in Lösung gebracht. Es wurden dann 50  $\mu$ l der Antikörperverdünnung dazugegeben und die Mikrotiterplatte für 5 min auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit Block-Puffer und anschließender Zentrifugation (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5804 R*, Eppendorf) bevor die Inkubation mit je 50  $\mu$ l des passenden fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers erfolgte. Der Zweitantikörperlösung wurde noch zusätzlich der Farbstoff DAPI (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation unter Lichtschutz und zwei weiteren Waschschrten mit Zentrifugation konnte das Zellpellet letztendlich in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und in ein mit weiteren 200  $\mu$ l PBS vorgelegtem Röhrchen überführt werden. In dieser Form der Zellsuspension konnte dann die Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Je nach Bedarf konnten die Röhrchen mit Aluminiumfolie abgedeckt

und bei 4 °C gelagert werden. Die Proben wurden spätestens 24 h nach Herstellung für die Messung eingesetzt.

### 4.6.2 Messung und Auswertung der Proben

Vor der Messung wurde durch Verwendung von isotoner Kochsalzlösung die Geräteempfindlichkeit justiert. Zur Optimierung der Messungen war es nötig Störgrößen wie die Autofluoreszenz und die durch unspezifische Antikörperbindung resultierenden Ungenauigkeiten auszuschalten. Das Prinzip der Autofluoreszenz basiert auf der Tatsache, dass einige Zellen die Fähigkeit besitzen durch Laserlicht zur Emission von Licht angeregt zu werden ohne dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen zu sein. Um solche Effekte auszuschließen wurden Kontrollproben hergestellt, die bis auf die Antikörperbeladung eine identische Behandlung hinsichtlich Inkubation und Waschschrritten erfuhren. Eine weitere Quelle für Messfehler ist die unspezifische Antikörperbindung aufgrund der Affinität von Antikörpern zu unspezifischen molekularen Strukturen. Dieses Hintergrundsignal lässt sich in der späteren Analyse herausfiltern, indem man eine Isotypenkontrolle durchführt. Dazu inkubiert man Proben mit Immunglobulinen der gleichen Klasse, die ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Für die Datenanalyse und -auswertung wurde das Programm *FACSDiva* herangezogen. Unter Benutzung dieses Programms kann schon während der Messung ein Analysefenster eingerichtet werden. Durch Setzen sogenannter *Gates* lässt sich die Zellpopulation anhand gewählter Merkmale eingrenzen. Die Grenzwerte für Fluoreszenz werden durch die Messung der Isotypenkontrolle bestimmt. Jede Intensität über der Isotypenkontrolle wird als positives Fluoreszenzsignal gewertet. Die Schwellenwerte für die Zellgröße und -granularität hingegen werden durch den Autofluoreszenzansatz festgelegt. Alle Impulse, die unter dem Schwellenwert liegen, finden keine Berücksichtigung und werden herausgefiltert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Histogrammen und korrelierten Zweiparameterdarstellungen (*Dot-Plot*). Bei den *Dot-Plots* werden zwei der untersuchten Parameter auf die Achsen eines Koordinatensystems aufgetragen und so zueinander in Beziehung gesetzt. Jeder Punkt repräsentiert in diesem Diagramm eine Zelle. Die Analyseröhrchen mit den in PBS aufgenommenen Zellen wurden vorsichtig an die Hohlneedle angeschlossen. Während der



Messung wurden die Röhrchen unter einer Aluminiumfolie vor Lichtexposition geschützt. Die Proben mussten innerhalb eines Zeitfensters von 1 h verwertet werden.

### **4.7 Kultivierung und Färbung der Fibroblasten für die Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Fibroblasten auf 12-Well-Platten (Nunc) in einer Dichte von 25000 Zellen je Well auf vorher platzierte Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium kultiviert bis zu einer von Konfluenz von ca. 20%. Es wurde eine niedrige Besiedlung mit ausreichendem Abstand zwischen den Zellen angestrebt, um eine Überlagerung der Zellen zu vermeiden. Das Vorgehen bei Anzucht und Mediumwechsel der 12-Well-Platten war ansonsten identisch zu der Kultivierung von 6-Well-Platten.

Die 12-Well-Platten wurden zweimal mit 1 ml PBS pro Well gespült. Nach Absaugen wurden die Wells mit 400 µl Histofix (*Roti®-Histofix 4%*, Roth) für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei ist zu beachten, dass Histofix Methanol enthält und eine Zerstörung von Aktinfilamenten nach sich zieht. Für die Färbung und Darstellung von beispielsweise Glattmuskelaktin wurde deswegen eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich) verwendet. Nach 4 min Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen für 30 min in 400 µl Blockpuffer (100 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 1% BSA, 5% Ziegenserum, pH 7,5) bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen im Rahmen der späteren Färbung zu besetzen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS, bevor die Zellen mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert wurden. Ab diesem Zeitpunkt wurde konsequent unter Lichtschutz gearbeitet. Die Primärantikörper wurden je nach Herstellerangaben in einer bestimmten Verdünnung mit einem Antikörperlösungspuffer (100 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% BSA, 0,1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) in Lösung gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS (RT) gewaschen. Anschließend wurde eine weitere Antikörperlösung mit dem fluorochromierten Sekundärantikörper in dem

vorgesehenen Verdünnungsverhältnis hergestellt. Der Lösung wurden zudem der fluoreszierende Farbstoff DAPI (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt, der sich direkt an seine Zielstrukturen anlagert ohne an Antikörper gekoppelt zu sein. Mittels DAPI lässt sich aufgrund von Interkalation an AT-Basenpaare der Zellkern direkt anfärben. Von diesem Gemisch wurden dann 300 µl in jedes Well pipettiert und die Platte für 45 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Lösung abgesaugt und die Wells dreimal mit PBS gespült, beim letzten Waschschrift wurde das PBS auf den Zellen belassen. In einem letzten Schritt wurden die Proben in *Fluoromount-G* (SouthernBiotech) eingedeckelt. Die Betrachtung der Proben erfolgte unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop *IX81-ZDC* von Olympus. Die Aufnahmen wurden mit der Software *ExcellencePro* (Olympus) aufgezeichnet und bearbeitet.

### 4.8 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.8.1 Proteingewinnung aus Zellen

Zur Proteinisolation wurden die 6-Well-Platten mit den Fibroblasten zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden dann auf Eis ausgeführt. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 100-120 µl RIPA-Puffer (15,7 mM Tris-HCl, pH 7,5, 58,4 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) je Well lysiert. Der Puffer wurde zuvor mit einem Phosphatase (*Phosphostop*, Roche) - und Proteaseinhibitor (*complete*, *Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) supplementiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die restlichen adhärenen Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt) gelöst und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Abschließend wurde das Zelllysate bei 13000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf) und der Überstand mit den Zellproteinen in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß aliquotiert.

### 4.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmengen erfolgte anhand der Messmethode nach Bradford (Bradford 1976). Dabei kommt es zu einer Reaktion zwischen dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250* und den basischen sowie aromatischen Seitenketten der Aminosäuren. Als Folge der Reaktion verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm, sodass ein Farbumschlag von rot zu blau erfolgt. Durch die Korrelation des Absorptionsshifts lässt sich auf die Konzentration eines Proteins rückschließen. Die Stärke des Absorptionsshifts ist dabei abhängig vom Proteingehalt. Voraussetzung für die photometrische Konzentrationsmessung ist zunächst die Erstellung einer Standardkurve mittels eines Standardproteins zur Kalibrierung. Hierbei wurde mittels Rinder-Serum-Albumin (*Bovine Immunglobulin G*, Sigma-Aldrich) eine Standardreihe in aufsteigender Konzentration von 0 bis 1020 µg/ml durch Verdünnung mit 0,1 M NaOH und anschließender Zugabe des Bradford-Reagenz (*Roti®-Nanoquant*, Roth) in einer 1-cm-Polystyrol-Küvette (Sarstedt) angefertigt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben wurden 5 µl des Lysats mit 200 µl Bradford-Reagenz sowie 795 µl 0,1 M NaOH versetzt. Nach Hinzugeben des Bradford-Reagenzes sowohl zum Standardprotein als auch zu der Proteinprobe ist zu beachten, dass eine Inkubationszeit von 10-15 min bei Raumtemperatur eingehalten werden muss. Anschließend wurde die Messung am Photometer (*BioPhotometer 6161*, Eppendorf) in Form von Duplikaten durchgeführt.

### 4.8.3 Vorbereitung der Proteinlösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Vorfeld der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben in SDS-haltigem Proteinpuffer (40 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0,01% Bromphneolblau, 10% Glycerol, 100 mM DDT, pH 6,8) für 5 min auf 95 °C erhitzt, um so eine Denaturierung des Proteins herbeizuführen. Nach einer Abkühlungsphase von fünf Minuten auf Eis wurden die Proben für kurze Zeit zentrifugiert (Kühlzentrifuge *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf).

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

Die Auftrennung der denaturierten Proteine nach Größe erfolgte mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (Laemmli 1970) in eigens hergestellten Polyacrylamidgelen. Bei diesem Verfahren werden die Proteine anfangs in einem Sammelgel konzentriert, um dann anschließend einen optimalen Siebeffekt im Trenngel zu erzielen. Entsprechend des Molekulargewichtes der Zielproteine wurden 10-12%-Polyacrylamidgele (Trenngel: 375 mM Tris-Base, pH 8,8, 10-12% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 29:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,03% TEMED; Sammelgel: 125 mM Tris-Base, pH 6,8, 5% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 29:1, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED) verwendet. Als Laufpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffersystem (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Zur Darstellung des Molekulargewichts wurden zudem stets Markerproteine (*Precision Plus Protein Standard™*, Bio-Rad) mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 20 Minuten bei einer Spannung von 80 V begonnen bis die Lauffront den Übergang von Sammelgel und Trenngel erreichte und im Anschluss bei einer Spannung von 120 V beendet. Für die gesamte Versuchsanordnung wurde das *Mini Protean 3*-Elektrophoresesystem von Bio-Rad verwendet.

### 4.8.5 Immunoblot und Immunodetektion

Beim Immunoblot erfolgte der Proteintransfer von den Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran (*Protan® BA 85*, Schleicher und Schuell). Dazu wurde im *Mini Trans-Blot Cell System* (Bio-Rad) eine Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für insgesamt 90 Minuten angelegt. Für die Versuche wurde die *Semidry-Blotting*-Methode mit kontinuierlichem Puffersystem (20% Methanol, 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) ausgewählt. Aufgrund der Wärmeentwicklung während des Elektrotransfers wurde die Apparatur in Eiswasser gekühlt.

Nach Abschluss des Transfers wurden die Nitrocellulosemembranen reversibel mit einer Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% 5-Sulfosalicylsäure) angefärbt, um zu überprüfen, ob ein Transfer der Proteine auf die Membran stattgefunden hat. In Einzelfällen wurde das Foto der Ponceau-Färbung

auch später als Beladungskontrolle bei der Auswertung hinzugezogen. Die Membranen wurden durch wiederholtes Waschen in TBS-T-Puffer (TBS-T, 0,1% Tween 20, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) entfärbt. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Membranen im Vorfeld entweder über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei RT in einer 5%igen Milchpulverlösung in TBS-T-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Das Milchpulver hat dabei die Funktion eine unspezifische Adhäsion der Antikörper an die Membran zu verhindern. In zwei darauffolgenden zehninütigen Waschschritten mit TBS-T-Puffer wurde der Milchpulverüberschuss entfernt. Anschließend erfolgte der Inkubationsschritt im jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C oder wahlweise auch für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Antikörper wurden in vier Waschschritten zu je 7 min in TBS-T-Puffer entfernt. Als nächstes wurde die Membran für 1 h bei RT in Zweitantikörper-Lösung in TBS-T inkubiert und anschließend 4-mal für je 15 min mit TBS-T gewaschen.

Der Zweitantikörper enthält als Reporterenzym die Meerrettichperoxidase (HRP), die durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates zu einer Lichtemission führt. Die Visualisierung des Signals gelang durch den Einsatz einer CCD-Kamera (*VersaDoc Imaging System 4000 MP*, Bio-Rad). Als Chemilumineszenz-Substrat wurde überwiegend das Fertigreagenz ECL (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Eine Ausnahme stellte die Detektion des Proteins p-CREB dar. Diese gelang durch Einsatz des stärker wirksamen Substrates *Super Signal West Dura* (Thermo Scientific). Auf diese Weise konnten selektiv Proteinbanden sichtbar gemacht und mit dem Programm *Quantity One Software* (Bio-Rad) quantifiziert werden.

Für den Fall, dass Proteinbanden mit ähnlichem Molekulargewicht auf derselben Membran dargestellt werden sollten, wurde zur Auflösung der Antigen-Antikörper-Komplexe SDS/Mercaptoethanol-haltiger Puffer („*Strip-Puffer*“, 62,5 mM Tris, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS) verwendet. Dazu wurde die Membran in dem Puffer bei 55 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert. Nachdem die Membran dann mittels TBS-T-Puffer ausreichend gewaschen wurde, konnte die Membran zum Zwecke der Immunodetektion wiederverwendet werden.

## 5. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich damit, welche Effekte eine chronische Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade und der damit verbundene Anstieg von zellulärem cAMP auf kardiale Fibroblasten im Hinblick auf deren Funktionalität und Morphologie ausübt. Bisherige Publikationen belegen eine deutliche antifibrotische Wirkung zyklischer Nukleotide sowohl in kardialen als auch in Fibroblasten aus anderen Organen (Insel *et al.* 2012). Zu diesem Zweck wurden neonatale kardiale Rattenfibroblasten in Kultur genommen und 24 h lang kontinuierlich der Wirkung des  $\beta_{1/2}$ -AR-Agonisten Isoprenalin ausgesetzt. Hinter diesem Ansatz steckt die Idee das Stressmodell der chronischen Katecholamin-Exposition *in vitro* zu simulieren. Im Folgenden wurden die Auswirkungen einer solchen chronischen  $\beta$ -AR-Aktivierung auf die Transformation kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten durch Detektion bekannter profibrotischer Marker wie  $\alpha$ -SMA (*alpha-smooth muscle actin*) oder CTGF (*connective tissue factor*) im Immunoblot analysiert. Die dabei erhobenen Befunde wurden teilweise noch in Form einer durchflusszytometrischen Analyse und immunhistochemischen Färbung gestützt. Zusätzlich wurden die Veränderungen im Rahmen der Signaltransduktion durch Messung der cAMP-Konzentration und der PKA-abhängigen Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) näher durchleuchtet.

Ein zweiter zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Rolle des  $\beta$ -AR-Signalverstärkers Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) in kardialen Fibroblasten zu untersuchen. Im Rahmen der Herzinsuffizienz-Forschung wurde I-1 bisher ausschließlich in Kardiomyozyten untersucht, wobei das Ausschalten dieses Verstärkers sich in mehreren Modellen positiv auf die Herzfunktion und das fibrotische Remodeling auswirkte (Wittköpper *et al.* 2010). Aus diesen Vordaten und der mehrfach publizierte antifibrotische Wirkung cAMP-abhängiger Signalwege (Kothapalli *et al.* 1998, Liu *et al.* 2010, Duncan *et al.* 1999) in Fibroblasten ergab sich die Frage nach der Funktion von I-1 in diesem Zelltyp. Dazu wurde in dem oben beschriebenen Modell eine inaktivierungsdefiziente Mutante des I-1 (S67A) durch adenovirale Transduktion überexprimiert.

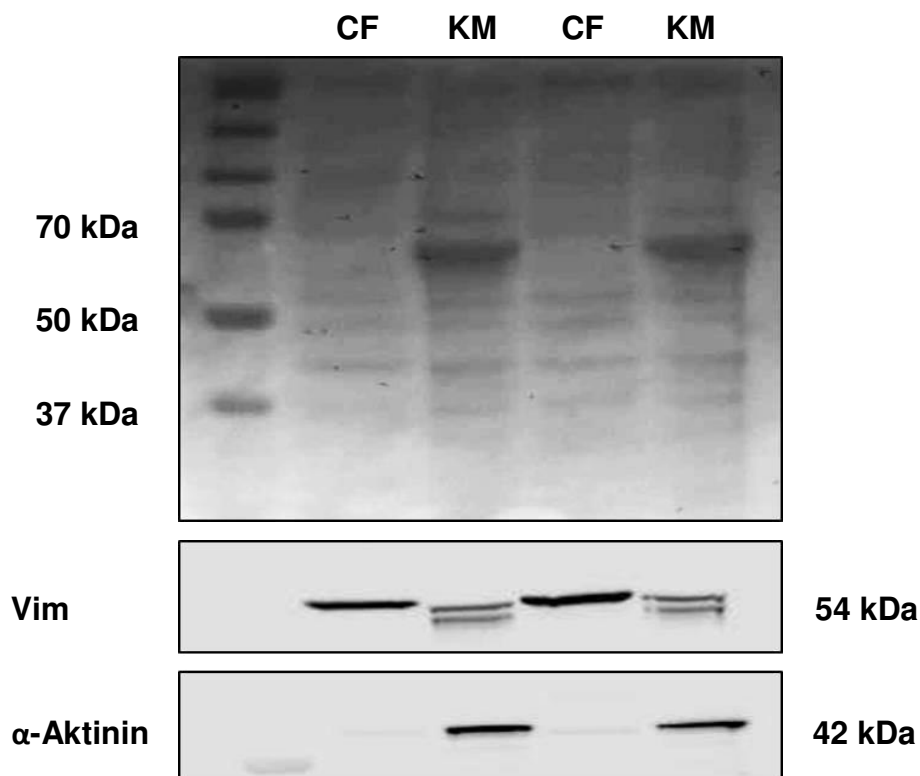
### 5.1 Etablierung

#### 5.1.1 Bestimmung des Reinheitsgrades der Fibroblastenkulturen

Die Anreicherung von Fibroblasten aus neonatalem Herzgewebe erfolgte über ein einfaches Verfahren, das sogenannte „*Pre-Plating*“. Nach Gewebsverdau und Zellvereinzelung wurde sich dabei die Tatsache zunutze gemacht, dass Fibroblasten an den unbehandelten Boden von Zellkulturschalen adhäreren, während die Kardiomyozytenpopulation und andere Zellen des Herzgewebes weitgehend in Suspension verbleiben und als Zellkulturüberstand abgenommen werden. Um die Anreicherung und damit den Erfolg des Verfahrens zu überprüfen, wurden Fibroblasten der Passage 0 bis zum Stadium der Konfluenz kultiviert und mit der Kardiomyozytenfraktion der gleichen Präparation bezüglich der Expression zelltypspezifischer Markergene verglichen. Dies geschah in Form einer Immunoblot-Analyse durch Benutzung von Antikörpern, die gegen charakteristische Strukturen der jeweiligen Zellart gerichtet sind. Wie in vielen Arbeiten zuvor wurde auch hier das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin als gängiger Marker für kardiiale Fibroblasten (Ieda *et al.* 2010) und  $\alpha$ -Aktinin zur Identifikation von Kardiomyozyten eingesetzt (Rose *et al.* 2008). Die Betrachtung des Immunoblots (Abb. 4) erlaubt die Schlussfolgerung, dass bei der Zellpräparation eine ausreichende Trennung von Fibroblasten und Kardiomyozyten im Sinne einer homogenen Zellkultur erzielt wurde. Während die Proteinproben aus den Fibroblastenkulturen kaum ein Signal für  $\alpha$ -Aktinin aufzeigten und damit mehr oder weniger ein Beleg für die Reinheit der Kulturen darstellen, musste für die Kardiomyozytenkulturen eine leichtgradige Vermischung mit mesenchymalen Zellen konstatiert werden, da sich in den Proben ein schwaches Signal für Vimentin nachweisen ließ. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich also der Schluss ziehen, dass bei den folgenden Experimenten von relativ homogenen Fibroblastenkulturen ausgegangen werden kann und so eine mögliche Fehlerquelle bei der Datenerhebung ausgeschaltet werden konnte. Dieses Resultat deckt sich darüber hinaus mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen, die nach jeder Zellpräparation routinemäßig durchgeführt wurde. Dort konnten in der Regel keine Zellnester kontrahierender Kardiomyozyten zwischen dem Zellrasen aus Fibroblasten ausgemacht werden. Da bei diesem Vorversuch zwei verschiedene Zellarten

## 5. Ergebnisse

gegenübergestellt wurden, konnte in diesem Fall nicht wie üblich das GAPDH als Ladekontrolle herangezogen werden. Mit diesem lassen sich nur Aussagen über die beladenen Proteinmengen innerhalb einer Zellart treffen, da das Verhältnis von GAPDH zum Gesamtproteingehalt zwischen den einzelnen Zelltypen stark unterschiedlich ist (Li und Shen 2013). Daher diente in diesem Fall die unspezifische Proteinfärbung mittels Ponceau als Ladekontrolle. Auf der Aufnahme der Färbung ist zu erkennen, dass sowohl für Kardiomyozyten als auch Fibroblasten ähnliche Mengen an Protein in die einzelnen Geltaschen aufgetragen wurden und somit eine direkte Gegenüberstellung gerechtfertigt ist.



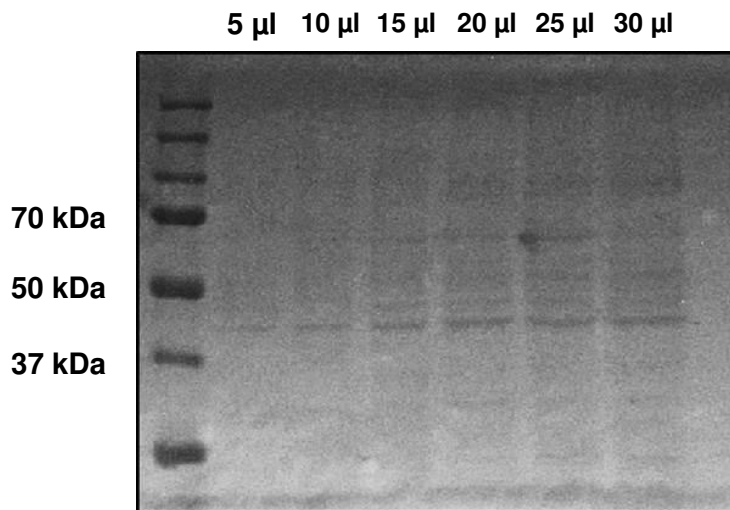
**Abbildung 4: Immunoblot zum Reinheitsnachweis der angesetzten Kulturen.** Vergleich von Fibroblasten (CF)- und Kardiomyozyten (KM)-kulturen der gleichen Zellpräparation. Fibroblasten der Passage 0 wurden in einer 15 cm-Schale kultiviert und anschließend zwecks Proteinisolierung in RIPA-Puffer lysiert. Dementsprechend wurden die Proteinproben aus Kardiomyozytenkulturen vorbereitet. Die Nitrocellulosemembran wurde mit Antikörpern gegen die zellspezifischen Markerproteine Vimentin und  $\alpha$ -Aktinin inkubiert. Als Ladekontrolle diente die Ponceau-Aufnahme.



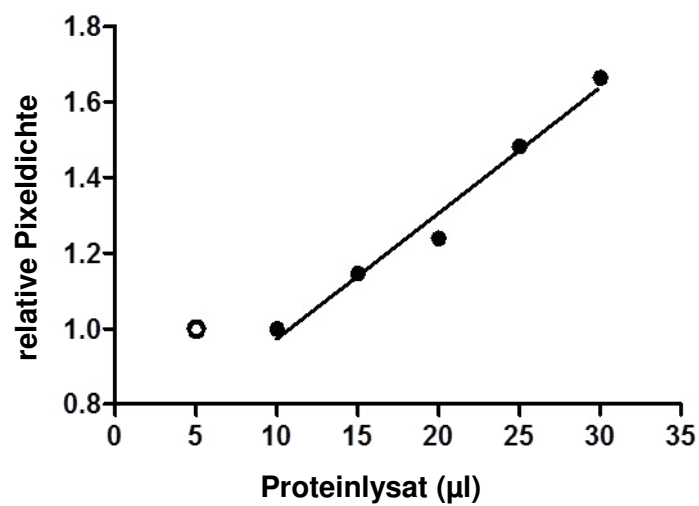
### 5.1.2 Normalisierung auf die Ponceau S-Proteinfärbung

Wie im Kapitel 5.1.1 vorher bereits aufgegriffen, lässt sich nicht immer ohne weiteres eine Normalisierung auf Haushaltsgene wie GAPDH durchführen. In solchen Fällen kann man häufig auf das Ponceau-Foto als Ladekontrolle zurückgreifen. Für den Beweis, dass dies möglich ist, wurde ein Immunoblot bis zur Entwicklung des Ponceau-Bildes in folgender Anordnung durchgeführt. Die Geltaschen wurden in ansteigender Reihenfolge mit Protein beladen. Die Proteinproben stammten aus einer beliebigen Fibroblastenkultur. In einem Koordinatensystem wurden die Intensitäten der gesamten Proteinspuren auf dem Ponceau-Bild gegen die Lysatmenge aufgetragen. Wie in Abbildung 5 zu sehen ergibt sich bei Anwendung einer Regressionskorrektur eine Ursprungsgerade, die einen linearen Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der geladenen Proteinmenge aufzeigt und somit demonstriert, dass sich das Ponceau-Bild als Ladekontrolle eignet. Allerdings ist auf dem Graphen angedeutet, dass man bei Beladungsmengen im unteren Bereich, hier 5  $\mu$ l, an die Grenzen der Genauigkeit stößt, da die Koordinate für das 5  $\mu$ l Proteinlysate etwas außerhalb der Regressionsgeraden liegt. Ähnliches lässt sich tendenziell auch für große Beladungsmengen schlussfolgern. Bei zunehmend großen Mengen ist eine lineare Korrelation beider Variablen nicht mehr gewährleistet. Um verlässliche Aussagen anhand der Messergebnisse treffen zu können, sollten bei der Gelelektrophorese Mengen gewählt werden, die in den linearen Bereich fallen. Schließt man die Koordinate für 5  $\mu$ l aus der Rechnung aus, ergibt sich die in Abbildung 5 dargestellte korrigierte Regressionsgerade mit genauerer Vorhersagekraft. Bei Gegenüberstellung beider Variablen, fällt jedoch auf, dass kein direkter Rückschluss von Pixeldichte auf Lysatmenge erfolgen kann. Die doppelte Menge Lysat führt nicht zu einer doppelten Pixeldichte. Diese Feststellung ist durch die Steigung der Geraden vorgegeben, welche hier nicht 1 beträgt. Vergleichbare Ergebnisse würde allerdings auch die Antikörperfärbung eines Referenzproteins im Immunoblot liefern.

**A**



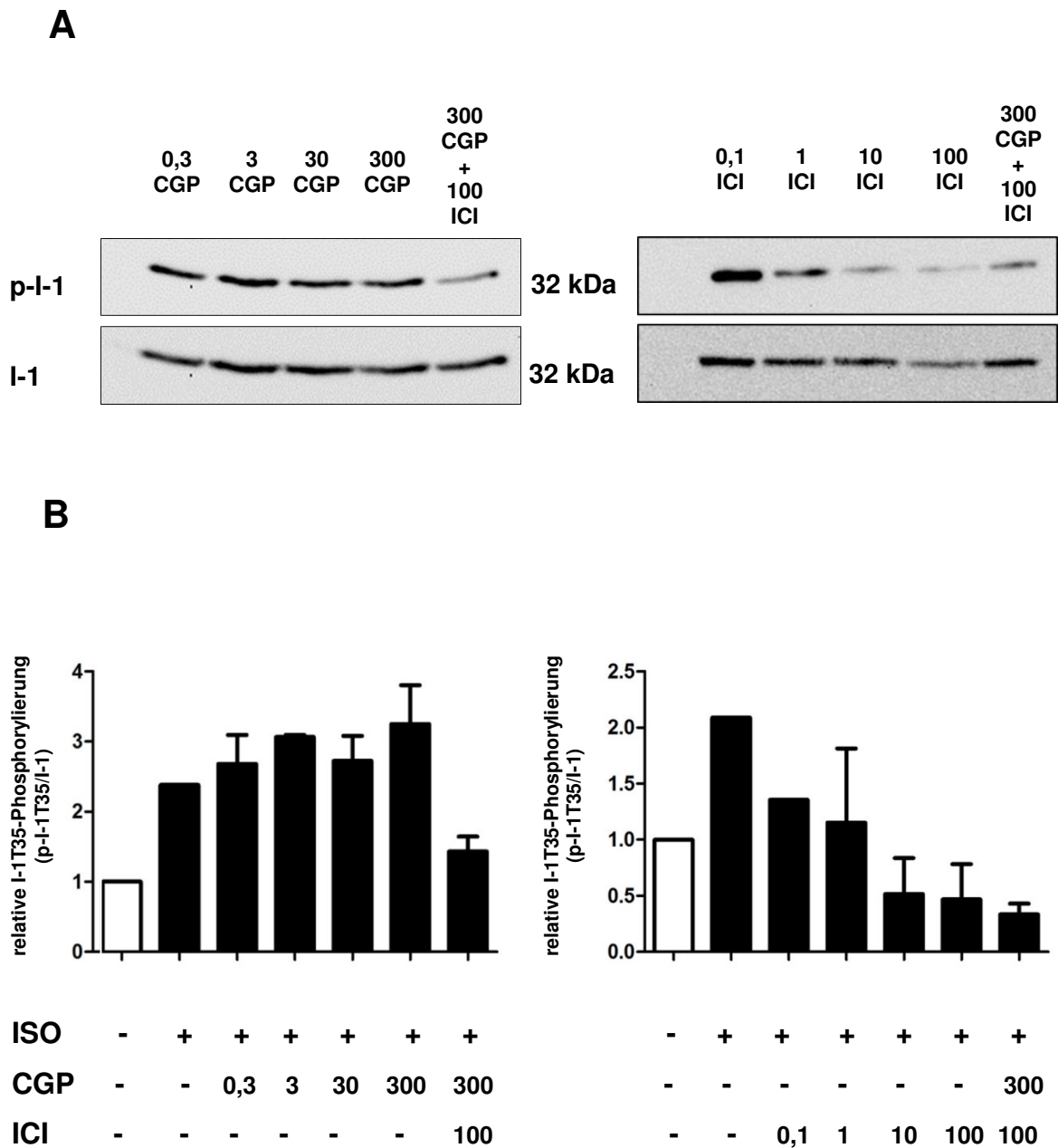
**B**



**Abbildung 5: Ponceau S-Aufnahme als Ladekontrolle.** Proteinlysate aus einer Fibroblastenkultur wurden in steigenden Volumina auf ein 12%-Gel geladen. (A) Immunoblot nach Ponceau S-Färbung. (B) Quantifizierung der Pixeldichte. In die Koordinaten wurde eine Regressionsgerade gelegt. Die gerade Steigung besagt, dass eine konstante Volumenzunahme eine konstante Zunahme der Signalintensität herbeiführt.

### 5.1.3 Analyse der $\beta$ -adrenergen Rezeptorverteilung auf Fibroblasten

Ziel der Arbeit war es, wie beschrieben, einen näheren Einblick in die Vorgänge des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs in Fibroblasten zu gewinnen. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten, die auf ihrer Oberfläche hauptsächlich zwei Subtypen ( $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) in einem Verhältnis von 80:20 (Wachter und Gilbert 2012) tragen, zeichnete sich für Fibroblasten aus unterschiedlichem Gewebe vor allem die Expression des Subtyps  $\beta_2$  ab (Gustafsson und Brunton 2000, Turner *et al.* 2003, Lamyel *et al.* 2011). Um der Frage nachzugehen, ob in dem gewählten *in vitro* Modell die Aktivierung der Signalkaskade besonders hinsichtlich der I-1-Phosphorylierung ausschließlich über den  $\beta_2$ -AR verläuft, wurden die Zellen zunächst mit der Wildtyp-Variante des I-1 adenoviral transduziert. In Folge der Signaltransduktion kommt es zu einer Phosphorylierung des I-1 an der Stelle T35 durch die PKA (Aitken und Cohen 1982), was gleichbedeutend mit einer Aktivierung ist. Diese Phosphorylierung wiederum lässt sich mittels einer Western Blot-Analyse durch Einsatz entsprechender phosphospezifischer Antikörper darstellen. Zur Rezeptorsubtypunterscheidung wurden die Zellen dann mit spezifischen Betablockern in aufsteigender Konzentration vorbehandelt. Als  $\beta_1$ -selektiver Adrenozeptor-Blocker wurden jeweils 0,3, 3, 30 und 300 nM CGP 20712 und als  $\beta_2$ -selektiver Adrenozeptor-Blocker 0,1, 1, 10 sowie 100 nM ICI 118551 verwendet. Vor der Lyse erfolgte eine Stimulation mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin für 10 min. Mit steigender Konzentration des Beta-blockers nimmt die Anzahl der freien Rezeptorbindungsstellen ab und umso geringer ist die Intensität des phosphorylierten I-1-Signals im Immunoblot, wie in der Abbildung 6 zu sehen ist. Die dargestellten Resultate (Abb. 6) zeigen, dass die Phosphorylierung des I-1 ihren Ursprung exklusiv in der Aktivierung des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors hat und bestätigen damit exemplarisch bereits publizierte Daten zur Rezeptorsubtypverteilung in Fibroblasten. Die Daten demonstrieren auch, dass der Rezeptor durch die Kultivierungsbedingungen z.B. infolge einer Desensivierung nicht verloren geht und eine Stimulation mit Isoprenalin zu einer robusten Signalaktivierung in den Zellen führt, die eine 2-3-fache Steigerung der I-1-Phosphorylierung und damit auch I-1-Aktivität zur Folge hat. Aufgrund des geringen Probenumfangs lässt sich keine statistische Quantifizierung vornehmen. Anhand der Immunoblots zeichnet sich jedoch eine klare Tendenz ab, welche die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur unterstützt.

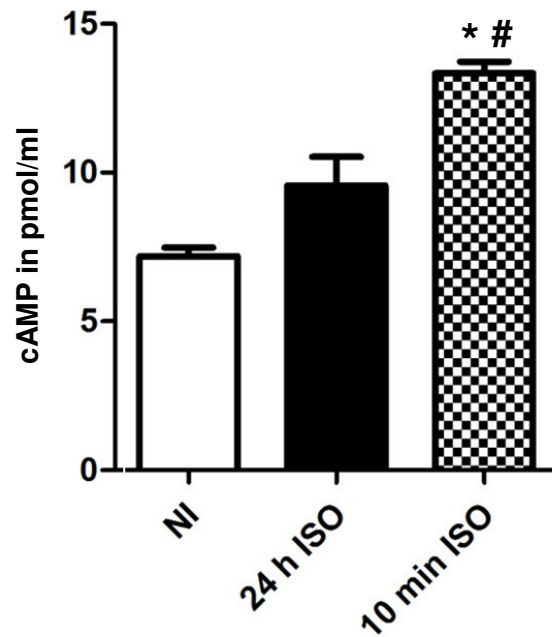


**Abbildung 6: Die  $\beta$ -AR-induzierte Phosphorylierung von überexprimiertem Inhibitor-1 wird über den  $\beta_2$ -AR vermittelt.** NRCF (P1) wurden auf 6-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und dann mit I-1T35-Adenoviren unter serumfreien Bedingungen für 3 h inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit spezifischen  $\beta_1$ -(CGP) und  $\beta_2$ -(ICI)Rezeptorblockern in ansteigender Konzentration bei gleichzeitiger Gabe von 1  $\mu$ mol Isoprenalin für 10 min behandelt. Nach der Stimulation wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert. (A) Repräsentative Immunoblots (B) Quantifizierung. Die Konzentrationen der Betablocker sind in der Einheit  $\mu$ mol angegeben. Die Normalisierung erfolgte auf den Gesamtproteingehalt von I-1. n=1 (unstimulierte und isoprenalinstimulierte Kontrollzellen) bzw. n=2 Replikate aus einer Zellpräparation.

## 5.2 Analyse einer chronischen $\beta$ -adrenergen Rezeptorstimulation in NRCF

### 5.2.1 Analyse des cAMP-Gehalts in der Zelle

In 5.1.3 konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation vorrangig über den  $\beta_2$ -AR erfolgt. Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, welche Konsequenzen eine chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation auf die Geschehnisse im Zellinnern insbesondere auf den *second messenger* cAMP haben könnte. Das cAMP ist der Phosphorylierung von Zielproteinen wie z.B. dem CREB durch die PKA als elementarer Bestandteil der chemischen Signalweiterleitung vorgeschaltet. Isoprenalin bewirkt über die Bindung an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren einen Anstieg von cAMP. Es handelt sich dabei um eine schnelle Zellantwort. Für die Versuche wurde das cAMP Assay-Set der Firma R&D System verwendet und nach dem im Kapitel 4.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die neonatalen Kardiofibroblasten wurden für 10 min bzw. für 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin inkubiert, sodass eine direkte Gegebenüberstellung von akuter und chronischer Simulation vorgenommen werden konnte. Die 24-stündige Applikation von Isoprenalin ist ein anerkanntes chronisches *in vitro* Stressmodell, das z.B. in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten hypertrophes Wachstum auslöst (Vettel *et al.* 2014). Nach 10-minütiger Stimulation konnte ein Anstieg des cAMP um 185% ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 7). Interessant war es nun zu sehen, wie sich eine chronische Aktivierung auf den cAMP-Spiegel auswirkt. Sogar nach 24 h ließen sich noch leicht erhöhte cAMP-Spiegel messen. Die Messungen ergaben, dass der cAMP-Spiegel zwar immer noch 33% ( $p = 0,04$ ) über dem Basalniveau lag, jedoch um etwa 52% im Vergleich zur 10 Minuten-Bestimmung abgesunken war (Abb. 7)



**Abbildung 7: Analyse des cAMP-Spiegels nach akuter und chronischer  $\beta$ -AR-Stimulation.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz unter serumfreien Bedingungen in zwei Versuchsansätzen für 24 h bzw. 10 min mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Anschließend wurden die Proben gemäß Herstellerangaben für die cAMP-Messung aufbereitet. Abkürzungen: NI, *no intervention*; ISO, Isoprenalin. Für die 10-Minuten-Messung lagen insgesamt 3 Proben aus einer Präparation ( $n=3\pm$ SEM), für die 24-Stunden-Messung und die Negativkontrolle 6 Proben aus einer Präparation ( $n=6\pm$ SEM) vor. Statistik: *One-way ANOVA* mit *Post-test Bonferroni*, \* $p<0,05$  vs NI und # $p<0,05$  vs 24 h ISO.

### 5.2.2 Vergleich der CREB-Phosphorylierung nach akuter und chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

cAMP steht am Anfang einer Signalkette, die über weitere Mechanismen zu einer Phosphorylierung von Zielproteinen führt. Nach Analyse der cAMP-Regulierung in chronischen Stimulationsversuchen wurde anschließend die Signaltransduktion weiterverfolgt. Als Zielprotein zur Veranschaulichung der Mechanismen nach einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorstimulation wurde unter anderem der Transkriptionsfaktor CREB ausgewählt. Wie das cAMP gehört auch die Phosphorylierung von CREB zur schnellen Rezeptorantwort. Durch Bestimmung des Proteins können Aussagen über den Aktivierungs- und Phosphorylierungsstatus einer Zelle getroffen werden, da CREB nach  $\beta$ -adrenerger Rezeptorstimulation durch die PKA phosphoryliert (Yamamoto *et al.* 1988) wird. Es stellt somit einen vorläufigen Endpunkt der schnellen Zellantwort dar. Vorteilhaft ist dabei, dass es endogen im Herzen in ausreichenden Mengen exprimiert (Ozgen *et al.* 2008) wird und so für proteinbiochemische Verfahren gut zugänglich ist. In zwei Versuchsansätzen wurden eine akute und eine chronische Isoprenalingabe im Immunoblot verglichen. Dazu wurden jeweils NRCF der ersten Passage nach Erreichen der Konfluenz entweder für 10 min oder für 24 h, wie in 4.3 beschrieben mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Als Kontrollen wurden stets unbehandelte Fibroblasten in beiden Versuchsansätzen mitgeführt. Durch Benutzung von einem Antikörper gegen das phosphorylierte CREB (p-CREB) konnte die Proteinmenge auf der Nitrocellulosemembran immunologisch detektiert werden. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. Erwartungsgemäß kam es nach einer akuten Isoprenalinstimulation zu einer vermehrten Phosphorylierung von CREB. Der Gehalt an p-CREB stieg in den behandelten Zellen um 139% im Vergleich zu der Referenzkultur an. Im zweiseitigen t-Test wurde die statistische Signifikanz bestätigt ( $p < 0,001$ ). Bei der chronischen Isoprenalinstimulation ergab sich dagegen ein anderes Bild. Hier konnte kein Unterschied mehr im Phosphorylierungsniveau zu der Kontrollkultur festgestellt werden, d.h. es lag die gleiche Menge an phosphoryliertem CREB in beiden Kulturen vor.



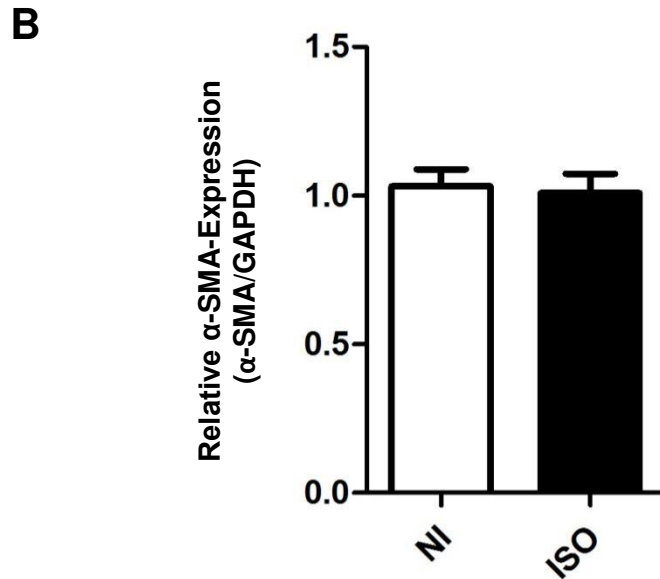
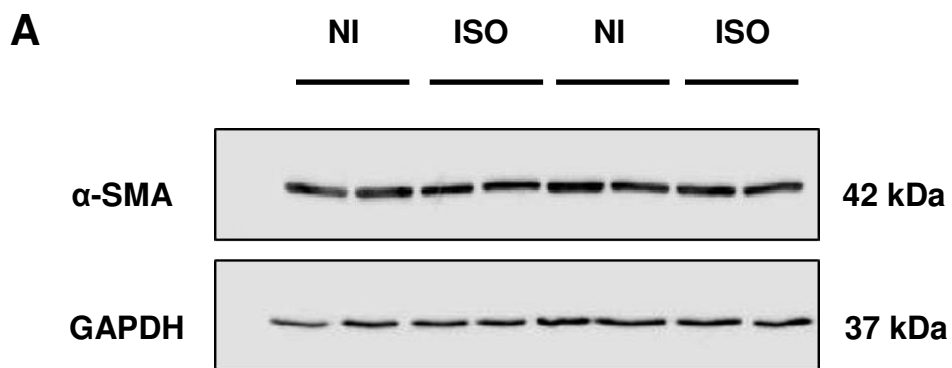


### 5.2.3 Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Nachdem die akute Aktivierbarkeit der  $\beta$ -adrenergen Kaskade *in vitro* gezeigt werden konnte, wurden nun im nächsten Schritt die Langzeitauswirkungen einer chronischen Rezeptorstimulation auf das Expressionsverhalten von kardialen Fibroblasten untersucht. Dazu wurden profibrotische Marker wie  $\alpha$ -SMA und CTGF herangezogen. Dem *second messenger* cAMP werden bekanntermaßen antifibrotische Eigenschaften zugeschrieben (Insel *et al.* 2012). Es stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch durch eine chronische Isoprenalinstimulation in NRCF herbeigeführt werden kann. Bisher ist bekannt, dass Katecholamine und Prostazykline, die eine Anhebung des cAMP-Spiegels nach sich ziehen, zu einer Suppression beispielsweise von Kollagen, einem wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix führen (Salzmann *et al.* 1981, Liu *et al.* 2010). Zu diesem Anlass wurden NRCF der Passage 1 und 2 für 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Um einigermaßen konstante Wirkspiegel zu erzielen, wurde die Gabe von Isoprenalin nach 12 h wiederholt. Mögliche antifibrotische Effekte wurden zunächst anhand des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA analysiert.

Bei Betrachtung der Abbildung 9 fällt auf, dass bereits das basale Expressionsniveau von  $\alpha$ -SMA ausgesprochen hoch ist. Die hier gezeigten Fibroblasten exprimieren große Mengen dieses Proteins, obwohl sie keinem Stress durch pharmakologische Substanzen ausgesetzt wurden und spiegeln damit das bereits hinreichend beschriebene Phänomen von 2-D-Fibroblastenkulturen wider (Vozenin *et al.* 1998). Es ist schon seit längerem bekannt, dass isolierte Fibroblasten unter Standardzellkulturbedingungen zu Myofibroblasten transformieren, auch in Abwesenheit spezifischer profibrotischer Stimuli (Rohr 2011). Die  $\alpha$ -SMA-Expression wird insbesondere durch die Steifigkeit der Adhäsionsfläche induziert (Goffin *et al.* 2006). In den durchgeführten Immunoblot-Analysen konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von  $\alpha$ -SMA nach 24-stündiger Stimulation mit Isoprenalin festgestellt werden. Das bedeutet zumindest für die  $\alpha$ -SMA-Induktion und den gewählten Zeitpunkt der Isoprenalin-Applikation, dass dieses Myofibroblasten-Merkmal nicht durch  $\beta$ -AR-Stimulation ver-

hindert oder rückgängig gemacht werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnte in humanen Lungenfibroblasten eine Suppression von  $\alpha$ -SMA durch Einsatz von  $\beta_2$ -AR-Agonisten Formoterol und Olodaterol bereits nachgewiesen werden (Laymel *et al.* 2011).

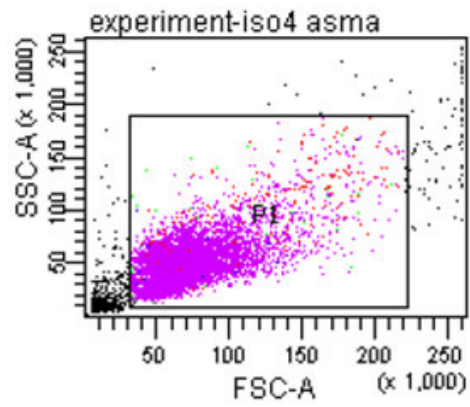


**Abbildung 9: Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression im Immunoblot nach chronischer  $\beta$ -AR-Stimulation.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) Repräsentativer Immunoblot (B) Quantifizierung. Abkürzungen: NI, *no intervention*; ISO, Isoprenalin. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH ( $n=16\pm$ SEM aus 2 Präparationen).

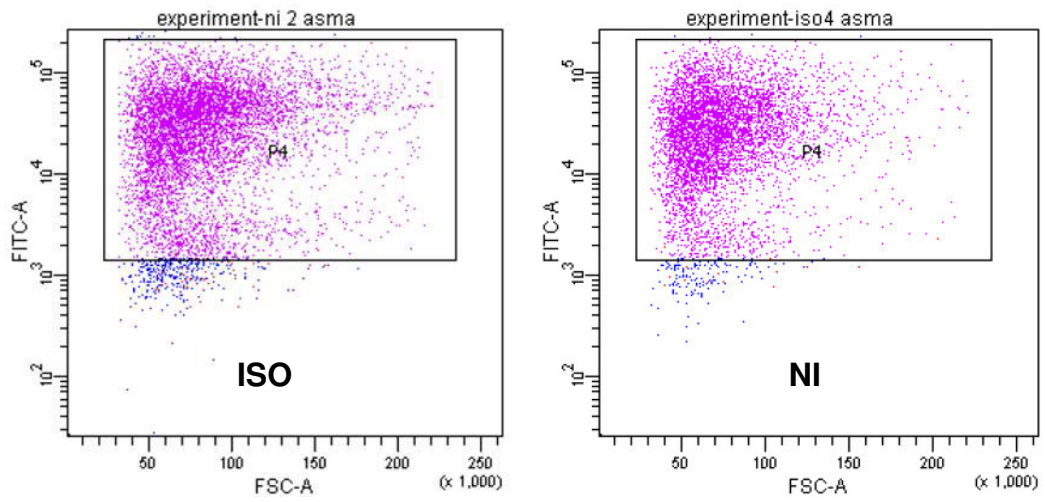
### 5.2.4 Untersuchung von $\alpha$ -SMA in der Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob die Ergebnisse aus der Immunoblot-Analyse hinsichtlich des  $\alpha$ -SMA in einer durchflusszytometrischen Messung reproduziert werden konnten. Die Kultivierung und Stimulation der Fibroblasten aus der ersten Passage wurde unter identischen Konditionen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 4.6.1 mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA markiert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung ergab ein vergleichbares Resultat wie im Immunoblot. Auch hier hat sich kein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster zwischen stimulierten Zellen und den Kontrollen herauskristallisiert. Zwar wurde ein Anstieg des  $\alpha$ -SMA von 15% nach chronischer Isoprenalinbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Referenzkultur gemessen, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,13$ ). Einschränkend kommt hinzu, dass keine Normalisierung vorgenommen wurde. In der Abbildung 10 sind die für FACS-Analysen typischen korrelierten Zweiparameterdarstellungen (*Dot-Plots*) aufgezeigt. Mithilfe der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung im Streulichtdiagramm wurden zunächst die Fibroblasten herausselektiert und von Zelltrümmern oder verbliebenen Kardiomyozyten getrennt. Die Analyse der Hintergrundbelastung per Isotypenkontrolle und der Autofluoreszenz ermöglicht das Setzen weiterer sogenannter *Gates*, sodass eine exakte Typisierung der Fibroblasten anhand der Antikörpermarkierung vorgenommen werden kann. Das rechteckige Analysefenster repräsentiert die  $\alpha$ -SMA-positiven Fibroblasten. Die *Dot-Plots* in Abbildung 10 B lassen erahnen, dass auch hier der Großteil der Fibroblasten bereits basal  $\alpha$ -SMA exprimiert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den in 5.2.3 beschriebenen Erkenntnissen, die durch die Immunoblot-Analysen gewonnen wurden.

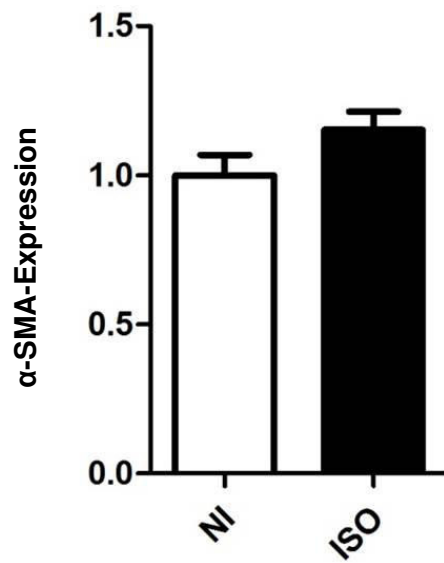
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 10: FACS-Analyse zur Bestimmung von  $\alpha$ -SMA in chronisch mit Isoprenalin stimulierten NRCF.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. (A,B) repräsentative *Dot-Plots* (C) Quantifizierung. Anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung im Streulichtdiagramm wurden die intakten Fibroblasten von Zelltrümmern getrennt (A). Jeder Punkt im Diagramm steht stellvertretend für eine Zelle. Mittels Fluoreszenzanalyse wurden dann die  $\alpha$ -SMA-positiven NRCF identifiziert und beide Gruppen, d.h. Isoprenalin-stimulierte und unbehandelte Zellen, miteinander verglichen (B). Die positiven Zellen wurden durch den Schwellenwert für die Fluoreszenz (Hintergrundfluoreszenz) bestimmt.  $n=6\pm$ SEM aus einer Präparation. Abkürzungen: FSC, *Forward Scatter*, erfasst die Zellgröße; SSC, *Sideward Scatter*, erfasst die Zellgranularität; FITC, Fluoreszenz; NI, *no intervention*; ISO, Isoprenalin.

### 5.2.5 Immunhistochemische Aufnahmen von $\alpha$ -SMA

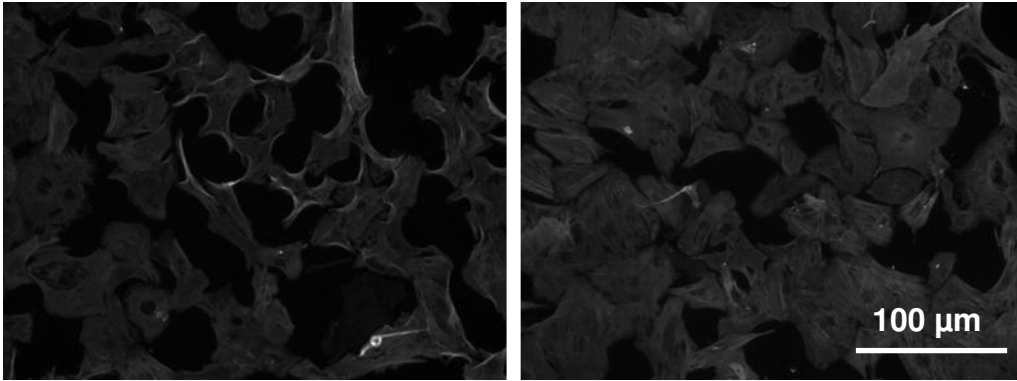
Anschließend wurde das Expressionsmuster der NRCF für  $\alpha$ -SMA und dessen Verteilung in der Zelle bildlich mittels immunhistochemischer Färbung festgehalten. Sowohl im Immunoblot als auch in der Durchflusszytometrie zeigten sich konstante  $\alpha$ -SMA-Spiegel in Fibroblasten nach chronischer Isoprenalinstimulation. Dieses Resultat wurde in der Immunhistochemie auch visuell überprüft. Außerdem diente die Färbung zur Feststellung der Lokalisation und Anordnung des  $\alpha$ -SMA in kardialen Fibroblasten. Dazu wurden die Zellen nach der Kultivierung wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben fixiert und zunächst mit spezifischen Antikörpern für  $\alpha$ -SMA markiert. Durch Einsatz von fluorchromierten Antikörpern gelang im Anschluss die Detektion von  $\alpha$ -SMA unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mittels DAPI, eines Fluoreszenzfarbstoffs, welcher die DNA interkaliert. Die Fibroblasten wiesen unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop in beiden Vergleichsgruppen keine offensichtlichen Unterschiede in Sachen Struktur und Morphologie in der Gesamtheit auf wie in Abbildung 11 zu erkennen, wenngleich die Fibroblasten sich untereinander innerhalb derselben Population diesbezüglich eher inhomogen präsentierten. Durch chronische Isoprenalinstimulation lässt sich also scheinbar keine charakteristische Veränderung der Fibroblasten induzieren. Die chronische Applikation scheint weder Einfluss auf An-

ordnung noch auf die Expression von  $\alpha$ -SMA zu nehmen. Auch die Morphe der Fibroblasten selbst ließ sich durch diese Intervention nicht modifizieren. Die Beobachtungen sind vereinbar mit den Resultaten aus den proteinbiochemischen Analysen. Hier konnte gleichermaßen kein Unterschied in der Menge an  $\alpha$ -SMA nach Stimulation ermittelt werden. Sowohl die stimulierten als auch die Kontrollfibroblasten boten kräftige Fluoreszenzen, die die hohen Expressionsspiegel von  $\alpha$ -SMA reflektierten und entsprechend hauptsächlich entlang der Stressfasern detektiert wurden. Das starke Signal für  $\alpha$ -SMA in beiden Kulturen ist auch ein Indiz dafür, dass bereits eine Transformation zu Myofibroblasten stattgefunden hat. Diese Feststellung steht im Einklang mit den zuvor gewonnenen Erkenntnissen aus Immunoblot- und FACS-Analysen. Wie auf den Aufnahmen in Abbildungen 11 B und C dokumentiert, sind  $\alpha$ -SMA-positive Stressfasern besonders prominent und sind teils klassisch parallel zu der Zellachse in Form von dicken Aktinbündeln durch das gesamte Zytoplasma gespannt (Hinz *et al.* 2001). Teilweise sind unter dem Mikroskop auch kreuzende Fasern zu erkennen, wie in den Abbildungen zu sehen ist. Wiederum andere Fasern weisen eine Bündelung entlang der Zellränder auf. Ruhende Fibroblasten enthalten insgesamt weniger mikrofilamentöse Stressfasern, die darüber hinaus eher diffus über das Zytoplasma verteilt sind. Dies sind typische Beobachtungen in 2-D-Fibroblastenkulturen (Hakkinen *et al.* 2011). Neben den Arealen parallel verlaufender Aktin-Stressfaserbündel kann in den Aufnahmen auch das Vorkommen sogenannter geodesischer Kuppeln, bestehend aus polygonal organisierten Stressfasern, registriert werden (Entcheva und Bien 2009). Ihre Erscheinung wird in der Literatur als vorübergehendes Konstrukt im Sinne einer Vorstufe der klassischen Stressfaserformation gewertet, wobei noch nicht ganz klar ist, ob ihre Entstehung künstlich durch die Trypsinierung herbeigeführt wird oder ob sie auch *in vivo* eine Alternative zu parallel verlaufenden Stressfasern darstellen. Unter diesen Gesichtspunkten kann man also zusammenfassen, dass die Morphologie des Aktinzytoskeletts von Zelle zu Zelle stark variiert. Die Vielfalt wird noch dadurch potenziert, dass die Fasern nicht nur starr in Form dieser beiden Endpunkte, also Stressfasern auf der einen und geodesischen Kuppeln auf der anderen Seite, auftreten, sondern auch jede beliebige Zwischenstufe einnehmen können, was durch die Mikroskopieaufnahmen gestützt wird.

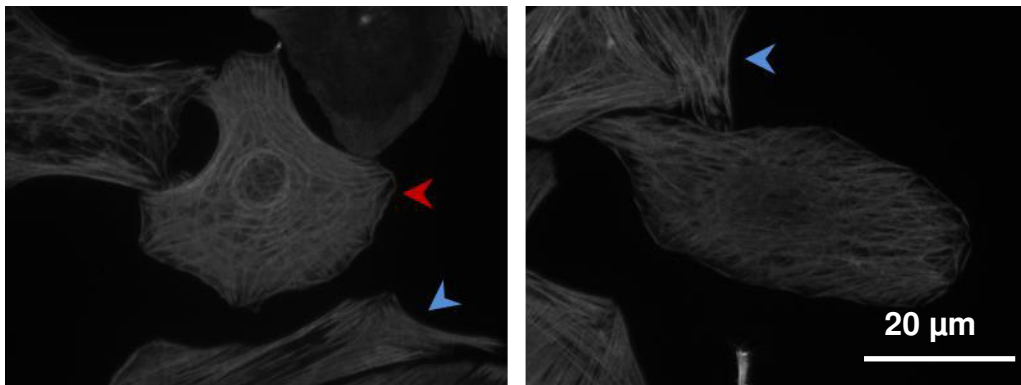
NI

ISO

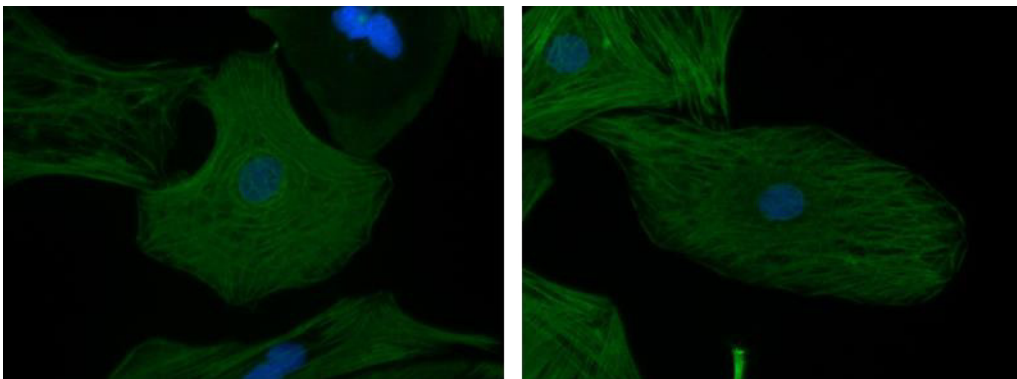
A



B



C

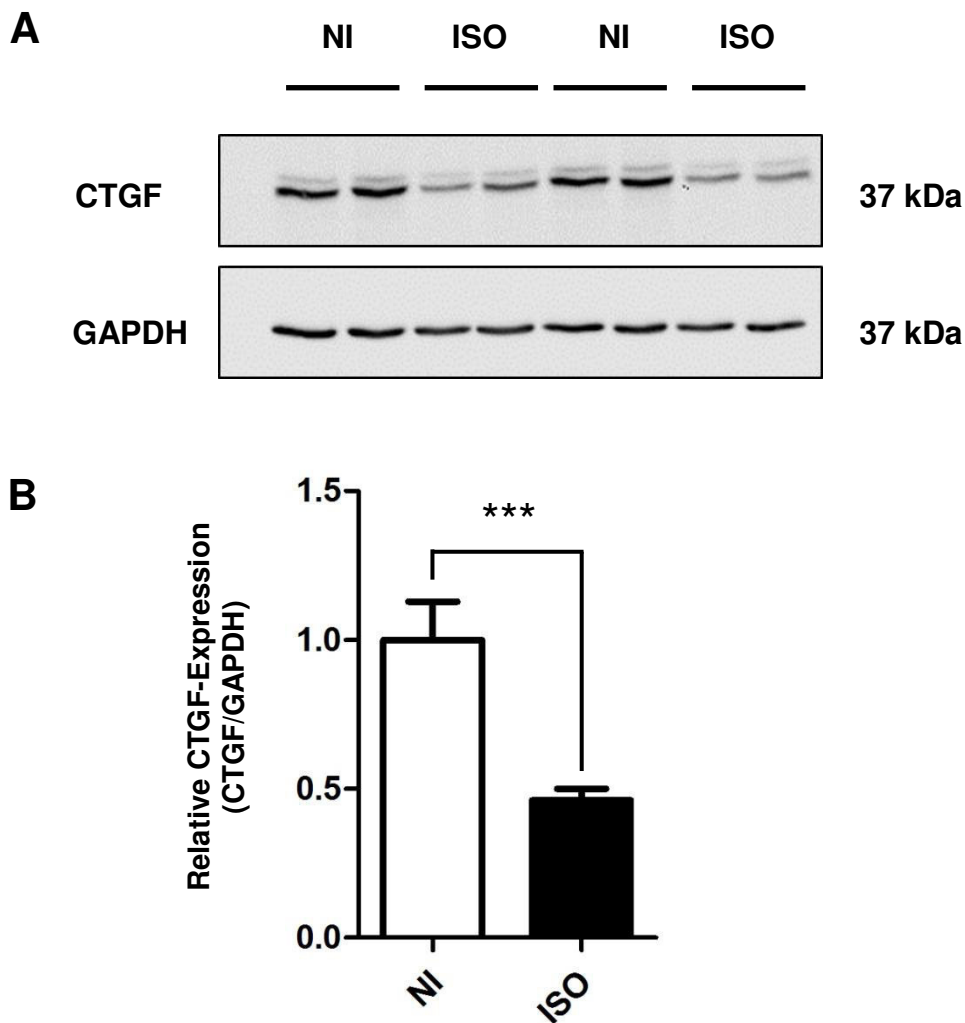


**Abbildung 11: Inverse Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von  $\alpha$ -SMA.** NRCF wurden subkonfluent unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellen wurden anschließend in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung ohne Zusatz von Methanol fixiert und gegen  $\alpha$ -SMA durch Verwendung eines  $\alpha$ -SMA-Antikörpers gefärbt. (A) exemplarische Übersichtsaufnahmen und (B) Nahaufnahmen der  $\alpha$ -SMA-Färbung (C) Fusionsbild aus  $\alpha$ -SMA- und Zellkernfärbung mit DAPI. Dargestellt sind die typischen Formationen der Aktinfilamentbündel. Die blauen Pfeile zeigen auf parallel verlaufende Stressfasern und der rote Pfeil auf eine geodesische Kuppelform.

### 5.2.6 Untersuchung der CTGF-Expression nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Als nächstes wurde die Frage aufgeworfen, ob eine chronische Isoprenalinstimulation für die Regulation von CTGF, einem weiteren profibrotischen Markerprotein, von Bedeutung ist. CTGF ist ein Fibrose-assoziiertes sekretorisches Wachstumsfaktor, von dem angenommen wurde, dass er eine wichtige Funktion bei der physiologischen Wundheilung übernimmt, aber auch im Rahmen krankhaft überschießender Gewebsproduktion eines Regenerationsprozesses eine entscheidende Rolle spielt (Leask 2003). Zur Quantifizierung von CTGF wurden NRCF-P1 und -P2 unter oben genannten Konditionen in Kapitel 4.3 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Die gewonnenen Proben wurden mittels Immunoblot analysiert. In der Tat zeigte sich in den Blots (Abb. 12) eine Suppression der intrazellulären CTGF-Spiegel um 66% in den behandelten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Referenzkultur. Im zweiseitigen t-Test konnte das Ergebnis als statistisch signifikant eingestuft werden ( $p=0,001$ ).

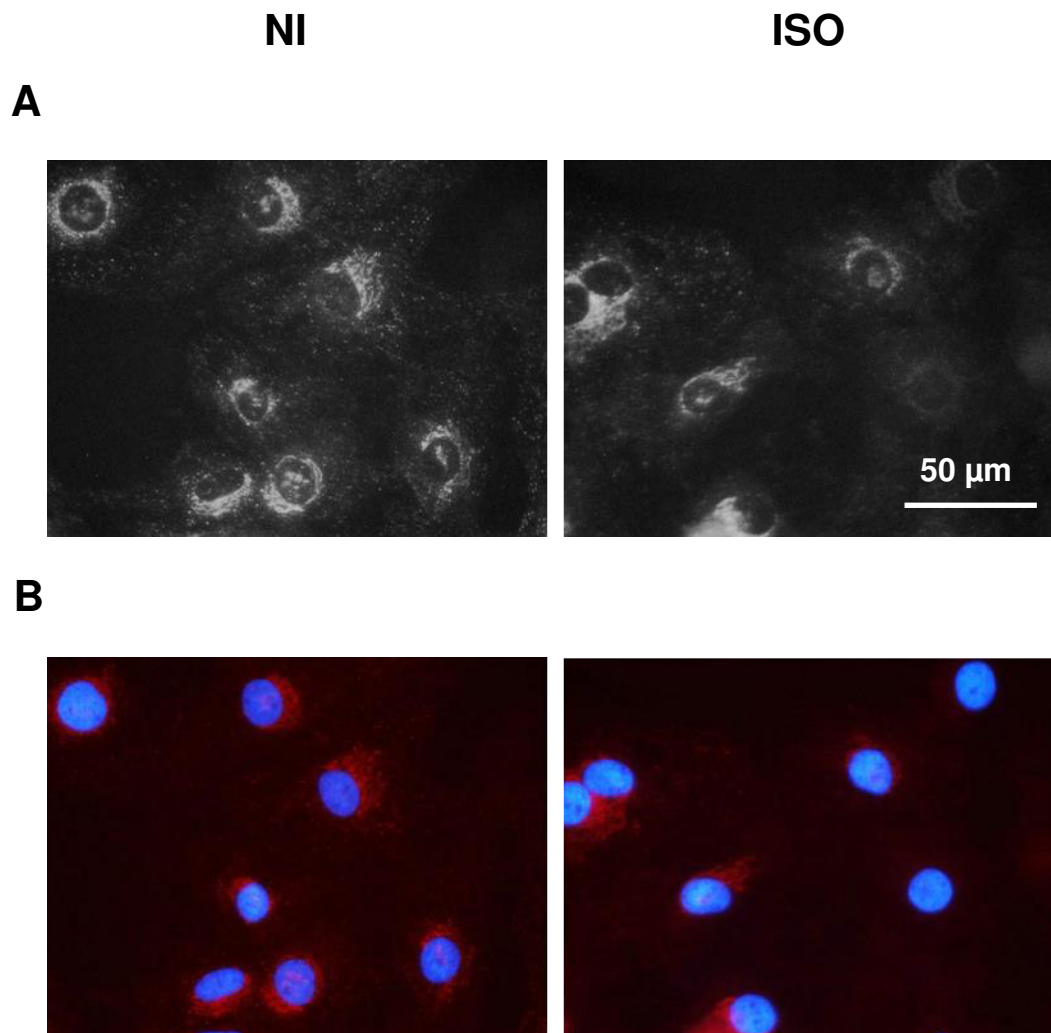




**Abbildung 12: Analyse der CTGF-Expression im Immunoblot nach chronischer  $\beta$ -AR-Stimulation.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) repräsentativer Immunoblot (B) Quantifizierung. Abkürzungen: NI, *no intervention*; ISO, Isoprenalin. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH ( $n=8\pm$ SEM). Statistik: Zweistichproben-t-Test, \*\*\* $p<0,001$ .

### 5.2.7 Immunhistochemische Visualisierung von CTGF

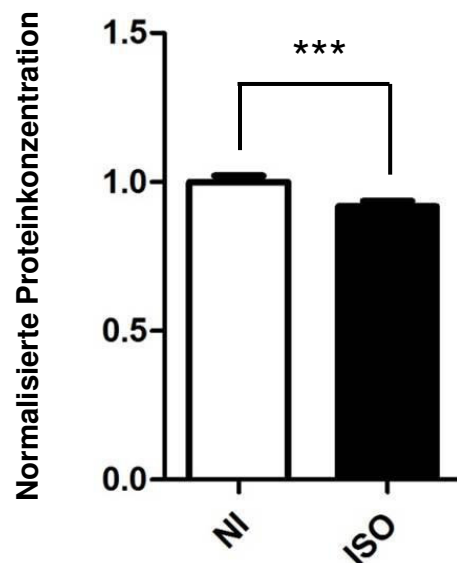
Analog zum  $\alpha$ -SMA wurde auch CTGF nach der quantitativen Darstellung im Immunoblot zusätzlich immunhistochemisch visualisiert. Dementsprechend wurden unbehandelte und chronisch stimulierte Fibroblasten hinsichtlich ihrer zellulären CTGF-Expression gegenübergestellt. Bei der Betrachtung waren außerdem die Lokalisation und die Anordnung des CTGFs im Zellinnern von Bedeutung. Nach entsprechender Kultivierung und Behandlung wurden die NRCF der ersten Passage dem Färbeprozess gemäß Kapitel 4.7 unterzogen. Durch Verwendung von Antikörpern gegen CTGF nach Fixierung der Zellen konnte das Expressions- und Sekretionsverhalten der Fibroblasten für dieses Protein unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. Anhand der Abbildung 13 lässt sich die in der Literatur beschriebene perinukleäre Lage von CTGF am Golgi-Apparat (Chen *et al.* 2001) sehr gut nachvollziehen, was durch eine kreisförmige Fluoreszenz rund um den Zellkern repräsentiert wird. Als sekretorisches Protein wird CTGF vom endoplasmatischen Retikulum in sekretorische Vesikel verpackt, zum Golgi-Apparat transportiert und von dort nach Modifikation an die Plasmamembran befördert. Die punktförmigen Fluoreszenzen in der Umgebung des Zellkerns stellen mit CTGF beladene Transportvesikel im Zytoplasma der Zelle auf ihrem sekretorischen Weg dar. Die Fluoreszenzintensität spiegelt dabei das Ausmaß der Proteinsynthese wider. Das CTGF wird letztendlich aus der Zelle in Richtung extrazelluläre Matrix geschleust. Obwohl die Immunhistochemie lediglich als ein semiquantitatives Verfahren einzuordnen ist, lässt sich bei Betrachtung der Aufnahmen die Tendenz ableiten, dass eine chronische Isoprenalinstimulation eine deutliche Abnahme der CTGF-Synthese und entsprechend CTGF-positiver Membrankompartimenten zur Folge hat. Die in der Immunhistochemie gemachten Beobachtungen korrespondieren daher mit dem im Immunoblot quantitativ bestimmten Rückgang von CTGF.



**Abbildung 13: Inverse Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von CTGF.** NRCF wurden subkonfluent unter serumfreien Bedingungen für 24 h mit Isoprenalin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte NRCF, die ansonsten unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellen wurden anschließend mittels Histofix fixiert und gegen CTGF durch Verwendung eines CTGF-Antikörpers gefärbt. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. (A) exemplarische Übersichtsaufnahmen. (B) Fusionsbild aus CTGF und Zellkernen nach Anfärben mit DAPI. Die ringförmige Struktur entspricht vermutlich der Ausdehnung des Golgi-Apparates in der Zelle, in dem das CTGF aufgenommen und gespeichert wird. Die punktförmigen Fluoreszenzen im Zytosol der Zelle werden durch CTGF-beladene Vesikel erzeugt.

### 5.2.8 Ermittlung der Proteinkonzentration

Am Ende der Arbeit wurden die ermittelten Proteinkonzentrationen aus allen chronischen Stimulationsversuchen vereint und eine Gegenüberstellung der stimulierten und nicht-stimulierten Kulturen mit gleicher Fibroblastenzahl vorgenommen. Dabei wurden lediglich die nativen Kulturen ohne adenovirale Transduktion mit berücksichtigt. Ein weiteres Kriterium für die Aufnahme war die chronische Isoprenalinstimulation. Auf diese Weise konnten Aussagen darüber getroffen werden, welche Effekte eine langandauernde Stimulation auf die Zelle ausübt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Tests bestimmt. Nach Auswertung der Messdaten zeigte sich, dass die Proteinkonzentration in chronisch stimulierten Zellen um 10% erniedrigt (Abb. 14) und damit möglicherweise hinweisend für eine verminderte Proliferation oder eine erhöhte Apoptoserate ist.



**Abbildung 14: Proteinkonzentrationsbestimmung nach chronischer Isoprenalinstimulation.** Der Probenumfang beträgt n=34 pro Gruppe. Abkürzungen: NI, *no intervention*; ISO, Isoprenalin. Statistik: Zweistichproben-t-Test, \*\*\*p<0,001.

### 5.3 Rolle des Inhibitor-1 in NRCF

Da der I-1 eine wichtige Funktion in der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade als Hemmer der PP-1 einnimmt (Aitken und Cohen 1982) und somit den Phosphorylierungsstatus in einer Zelle wesentlich mitbeeinflusst, wurden im zweiten Abschnitt der Arbeit die Auswirkungen einer I-1-Überexpression in NRCF näher analysiert. Für die Versuche wurde die Mutante I-1S67A ausgewählt. Ihre Besonderheit liegt in einem Aminosäureaustausch von Serin zu nicht phosphorylierbarem Alanin mit der Folge, dass diese Mutante nicht mehr als Substrat der PKC $\alpha$  (Braz *et al.* 2004, Sahin *et al.* 2006) infrage kommt und sich somit einer Aktivitätsminderung durch Phosphorylierung entzieht. Die Immunoblots aus den Abschnitten 5.2.2, 5.2.3 und 5.2.6 zur Bestimmung von  $\alpha$ -SMA, CTGF und p-CREB wurden nach Überexpression dieser I-1-Variante wiederholt mit der Fragestellung, ob der I-1 direkten Einfluss auf die Phosphorylierung und Expression dieser Proteine hat.

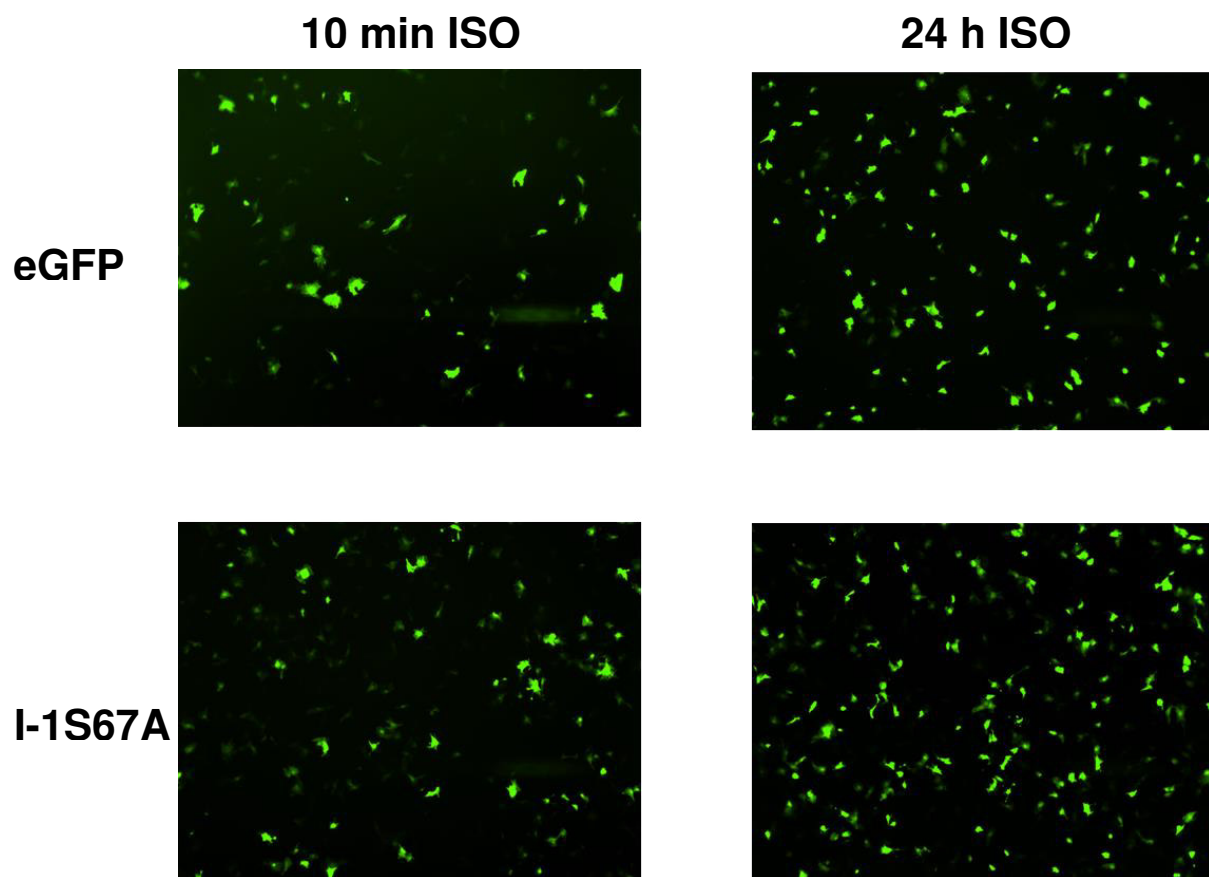
#### 5.3.1 Nachweis einer erfolgreichen Überexpression

Zunächst wurde die Funktionalität und Transduktionseffizienz der hier verwendeten adenoviralen I-1S67A-Konstrukte überprüft. Die NRCF wurden unter Verwendung eines serumfreien Mediums für 3 h mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurde von den Zellen nicht aufgenommenes Virus aus dem Kulturüberstand entfernt. Nach weiteren 36 h Inkubationszeit erfolgte die Behandlung mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin für 24 h. Da das Virus zusätzlich für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) kodiert, war es möglich die Transduktionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren. Dabei wurden schon früh die zytopathischen Effekte der Virusinfektion in Form von abgerundeten kugeligen und teilweise auch toten Zellen sichtbar. Um Effekte durch das eGFP auszuschließen, wurden parallel Kontrollen mitgeführt, die eine identische Behandlung erfahren haben, mit dem einzigen Unterschied, dass diese Zellen mit einem Virus inkubiert wurden, das ausschließlich eGFP exprimiert (Ad-eGFP). In einem Immunoblot wurde dann das Signal für die Expression des I-1 und das phosphorylierte I-1 (p-I-1) immunologisch detektiert. Auf der Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die Isoprenalin-stimulierten NRCF ein stärkeres Signal

für den phosphorylierten I-1 aufweisen als die transduzierten unbehandelten Proben. Das Isoprenalin setzt die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Gang mit dem Ergebnis, dass der I-1 durch die aktivierte PKA phosphoryliert wird. Dieser Vorgang lässt sich auf den Blots nachvollziehen. Es wurde ein Anstieg von 378% ( $p < 0,001$ ) an phosphoryliertem I-1 in den chronisch stimulierten transduzierten Zellen in Relation zu den unbehandelten transduzierten Zellen verzeichnet. In den mit Ad-eGFP transduzierten Zellen, lies sich kein endogenes I-1-Signal detektieren.

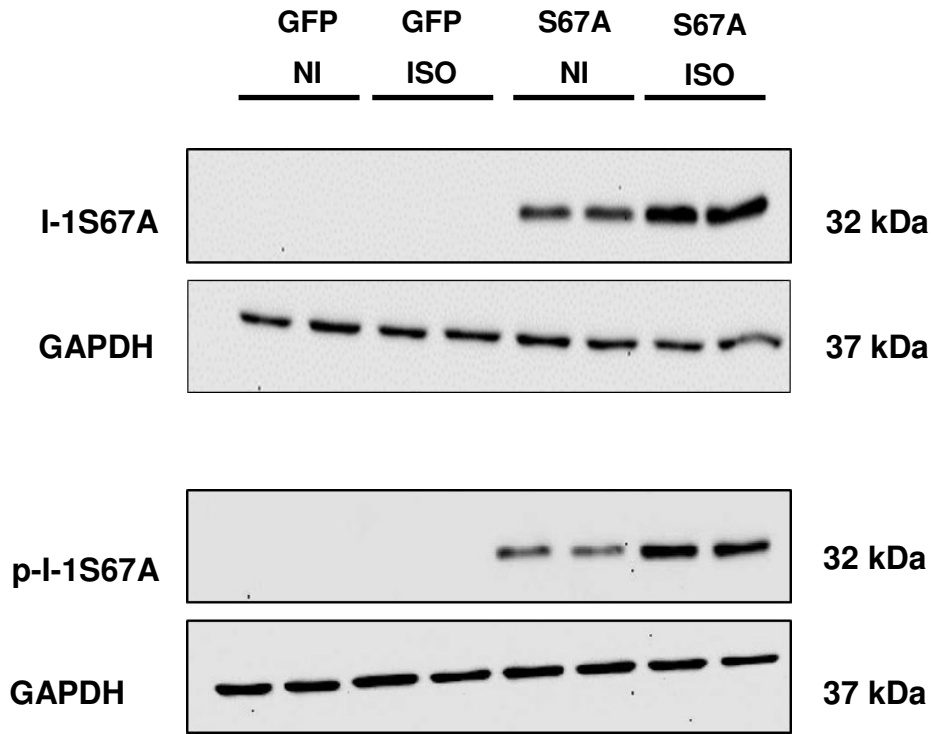
Ein überraschendes Resultat lieferte die Analyse des gesamten I-1-Proteingehaltes in diesem Kontext. Die Proben der chronisch stimulierten transduzierten Zellen wiesen ein Signal deutlich stärkerer Intensität auf als die unbehandelten transduzierten Zellen. Diese Beobachtung lässt die Vermutung nahe, dass die Gabe von Isoprenalin bei adenoviraler Transduktion zusätzlich eine erhöhte Expression des I-1 induziert. Insgesamt konnte ein Anstieg von 348% ( $p < 0,01$ ) bei den chronisch stimulierten Zellen verzeichnet werden. Bei Berücksichtigung der Daten stellt man fest, dass der verzeichnete Anstieg für den phosphorylierten I-1 nur zum kleinen Teil auf die steigende Phosphorylierung in Anwesenheit von Isoprenalin zurückzuführen ist. Der Hauptgrund liegt augenscheinlich an der erhöhten Expression von I-1 durch Applikation des Isoprenalins. Die Ratio von p-I-1/I-1 nach 24 h bleibt also weitgehend unverändert. Zur Veranschaulichung wurden p-I-1 und I-1 zueinander in einem weiteren Diagramm (Abb. 16 C) ins Verhältnis gesetzt. Aus dem Diagramm ist ein mäßiger Anstieg des phosphorylierten I-1 nach chronischer Isoprenalingabe zu entnehmen, der jedoch keine statistische Signifikanz aufweist. Dieser Befund ist vergleichbar mit dem Phosphorylierungsgrad von CREB nach chronischer Stimulation. Auch in dem Fall konnte nach 24 h kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Referenzgruppe beobachtet werden. Die gesteigerte Expression lässt sich mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität des CMV-Promotors (Salem *et al.* 2006) der adenoviralen Konstrukte erklären, welcher unter anderem Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor CREB besitzt (He und Weber 2004) und entsprechend nach  $\beta$ -AR-Stimulation vermehrt abgelesen wird. Diese Feststellung wird zusätzlich durch die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 15) gestützt. Sie dokumentieren eine gesteigerte Fluoreszenz in den stimulierten Zelle, was sowohl für die Ad-eGFP-transduzierten als auch die Ad-I-1S67A-transduzierten Kultu-

ren zutrifft und steht somit im Einklang mit den Western Blot-Analysen. Durch die Detektion des I-1-Signals wurde der Nachweis einer gelungenen adenoviralen Transduktion erbracht. Trotz des unveränderten p-I-1/I-1 Ratios lässt sich festhalten, dass am Ende der chronischen Stimulation mit Isoprenalin mehr p-I-1 in den Zellen vorhanden ist. So lässt sich in den folgenden Versuchen der Frage nachgehen, ob der I-1 als Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade die antifibrotischen Effekte von Isoprenalin steigert.

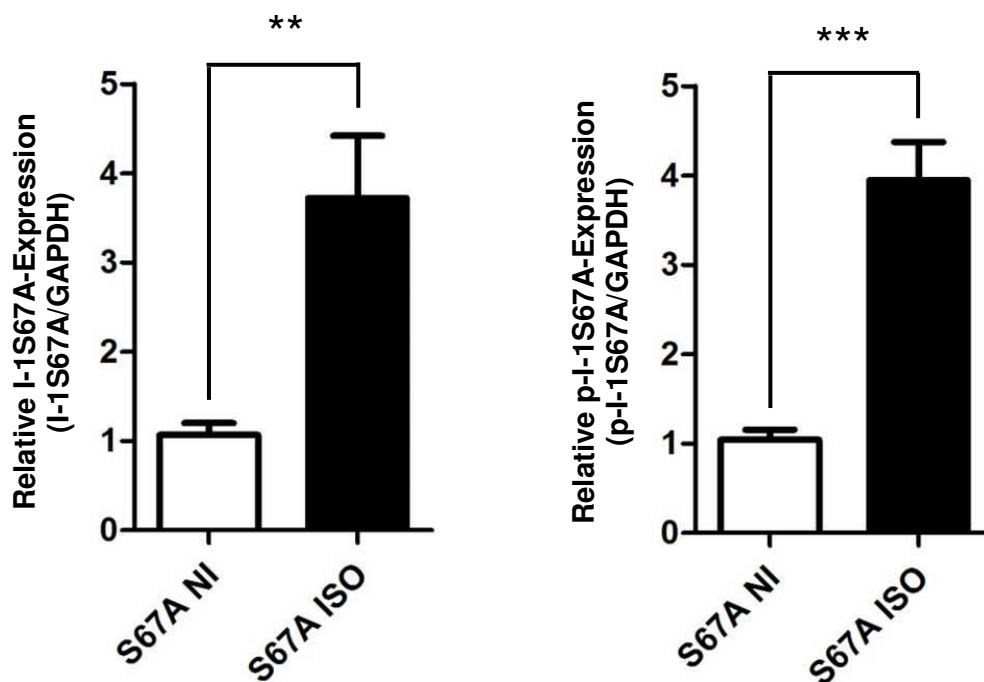


**Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der adenoviralen Transduktion mit Ad-eGFP und Ad-I-1S67A.** NRCF wurden nach Erreichen des Stadiums der Konfluenz für 3 h mit den entsprechenden Adenoviren unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach weiteren 36 h Inkubation mit frischem virusfreiem Medium wurden die Zellen für weitere 24 h mit Isoprenalin behandelt. Als Kontrollen wurden transduzierte unbehandelte NRCF herangezogen. Die Transduktion wurde in regelmäßigen Abständen fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen 60 h nach Virustransduktion, also die abschließenden Aufnahmen zu Versuchsende. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Expression der I-1-Mutante bzw. des eGFP.

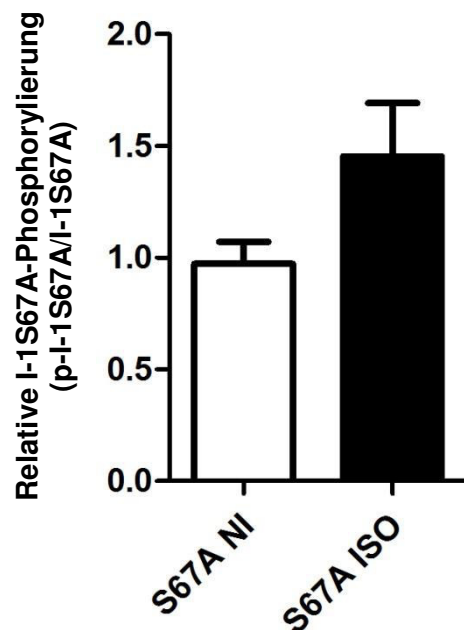
**A**



**B**







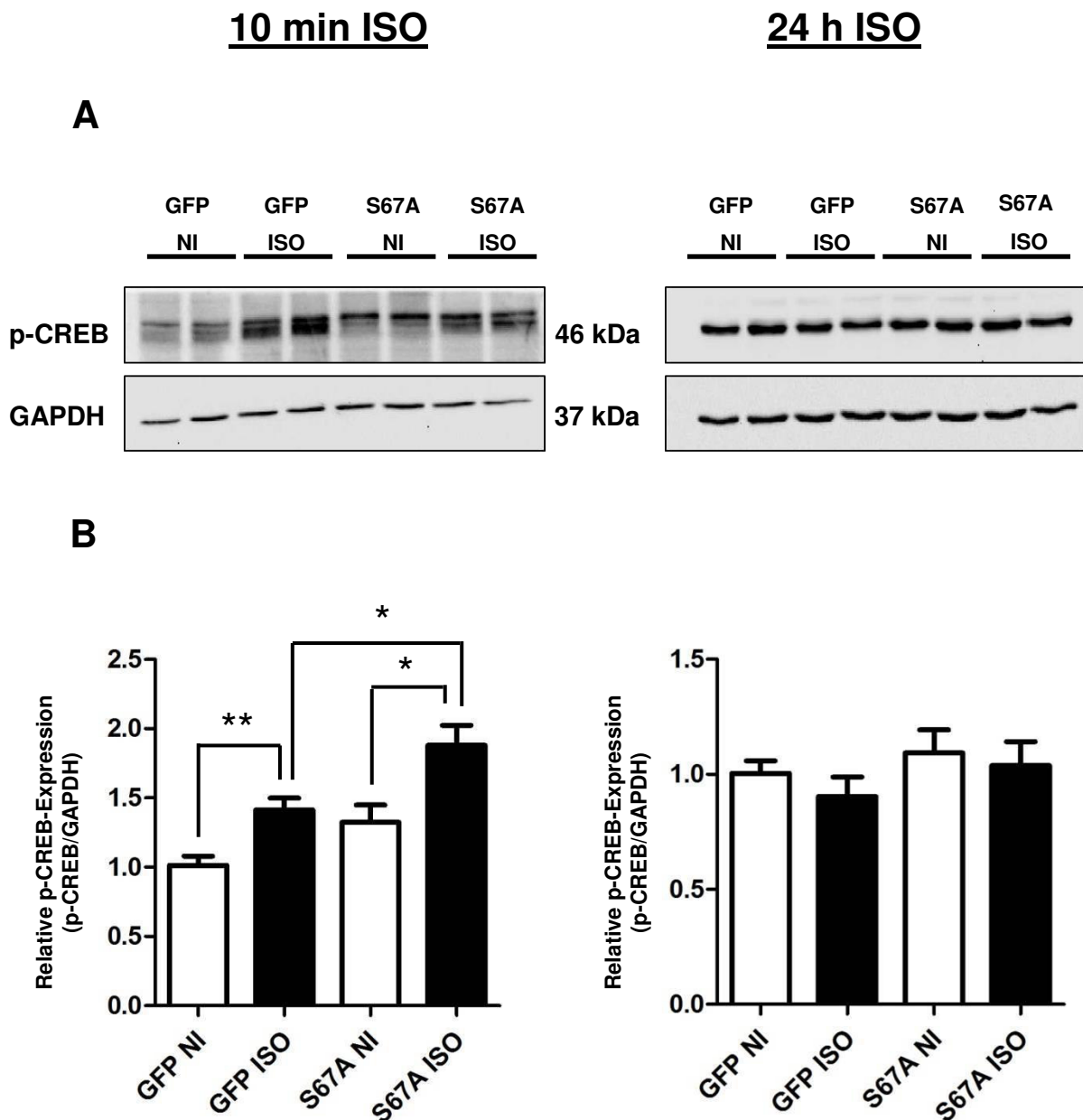
**Abbildung 16: Nachweis einer erfolgreichen adenoviralen Transduktion von Ad-I-1S67A im Immunoblot.** NRCF wurden nach Erreichen des Stadiums der Konfluenz für 3 h mit Ad-eGFP bzw. Ad-I-1S67A unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach 36 h Inkubation mit frischem virusfreiem Medium wurden die Zellen für weitere 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin (ISO) behandelt. Als Kontrollen wurden transduzierte unbehandelte NRCF herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) Immunoblot für die Detektion des I-1 und des phosphorylierten I-1S67A (B) Quantifizierung. Eine Normalisierung erfolgte zunächst auf GAPDH und den Gesamtproteingehalt von I-1. Für die Bestimmung von Gesamt-I-1 wurden 6 Proben ( $n=6\pm$ SEM aus 2 Präparationen, Statistik: Zweistichproben-t-Test,  $**p<0,01$ ) und von p-I-1 insgesamt 4 Proben verwendet ( $n=4\pm$ SEM, Statistik: Zweistichproben-t-Test,  $***p<0,001$ ).

### 5.3.2 Untersuchung der CREB-Phosphorylierung nach Überexpression von Inhibitor-1

Als nächstes erfolgte die Bestimmung von p-CREB im Immunoblot nach Überexpression des I-1 in den Fibroblasten. Wie im ersten Abschnitt der Arbeit wurde auch unter diesen Bedingungen eine Gegenüberstellung von einer akuten und chronischen Isoprenalinstimulation vorgenommen. Der I-1 hat in seiner Funktion als Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Phosphoproteinen. Der Transkriptionsfaktor CREB gehört zu der Gruppe der Zielproteine, die nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch die PKA phosphoryliert werden (Liu *et al.* 2006). Er kann somit als Indikator für die Phosphorylierungsaktivität in der Zelle nach Einbringen des I-1 herangezogen werden. Das Vorgehen zur Gewinnung der 24 h-Proben erfolgte nach dem Schema in Abschnitt 4.4. Die akute Stimulation der Fibroblasten für 10 min wurde 36 h nach Beginn der adenoviralen Transduktion durchgeführt. Direkt im Anschluss wurde dann die Zellyse zur Proteingewinnung vollzogen. Ziel war es den Einfluss des I-1 auf die Phosphorylierungsaktivität in den Fibroblasten im Rahmen der chronischen Isoprenalinstimulation näher zu untersuchen.

In den Ad-eGFP-transduzierten Kontrollen konnte wie zuvor in den nicht-transduzierten Fibroblasten eine vermehrte Phosphorylierung von CREB nach akuter Stimulation in Höhe von 40% ( $p < 0,01$ ) ermittelt werden (Abb. 17 B). Dies belegt, dass sich auch in diesem Fall die Effekte aus den Versuchen ohne adenovirale Transduktion nicht im selben Ausmaß reproduzieren ließen. So muss hier möglicherweise von einer störenden Interaktion in die Zellphysiologie durch adenovirale Transduktion ausgegangen werden, sodass die Wirkung von Isoprenalin nicht vollständig zur Entfaltung kommt. Bei den I-1-transduzierten Proben zeichnet sich eine Tendenz zur erhöhten Phosphorylierung von CREB unter basalen Bedingungen zumindest im Rahmen der akuten Stimulationsversuche ab ( $p < 0,05$ ). Durch akute Isoprenalinstimulation kommt es zu einer vermehrten Aktivierung des I-1, welcher in dieser Form die Proteinphosphatasen hemmt. Diese sind nun nicht mehr in der Lage, die Phosphorylierung von CREB zu antagonisieren. Auf diese Weise steigt insgesamt das Phosphorylierungsniveau in der Zelle. Dieser Effekt konnte im Rahmen der chronischen Stimulationsversuche nicht reproduziert werden, was jedoch den veränderten Kulturbedingungen geschuldet sein

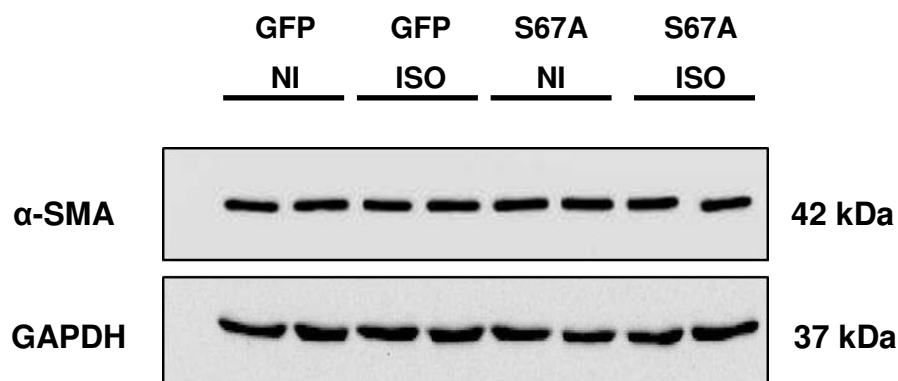
kann. Sowohl die stimulierten als auch die nicht stimulierten Zellen wurden in dieser Versuchsreihe 24 h länger in Kultur gehalten als die akut stimulierten Zellen. Insofern sind die Messdaten nicht uneingeschränkt vergleichbar. Bei akuter Stimulation der I-1-überexprimierenden Zellen kommt es zu einem zusätzlichen Anstieg der CREB-Phosphorylierung, die eine Zunahme um 80% ( $p < 0,001$ ) über dem Ad-eGFP-Basalwert erreicht und damit um 40% höher ist als in den stimulierten Ad-eGFP-transduzierten Zellen. Der Anstieg zwischen basal und ISO ist dagegen vergleichbar mit Ad-eGFP-transduzierten Zellen und liegt bei ca 55% ( $p < 0,05$ ). Nach chronischer Isoprenalinstimulation hat sich in den Ad-eGFP-transduzierten Fibroblasten ähnlich wie in den nicht transduzierten Kulturen zuvor kein Unterschied im Phosphorylierungsmuster von CREB herauskristallisiert. Da nach 10-minütiger Stimulation eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierung zu beobachten ist, kann man konstatieren, dass bei chronischer Stimulation das basale Niveau nach 24 h wiederhergestellt ist. Die Anwesenheit des I-1S67A scheint zudem keinen Einfluss auf diese Regulationsmechanismen zu haben. In den Versuchen mit Überexpression des I-1S67A konnten keine signifikanten Änderungen zu den Ad-eGFP-transduzierten Kontrollen, weder in den stimulierten noch in den unstimulierten Kulturen, dargelegt werden.

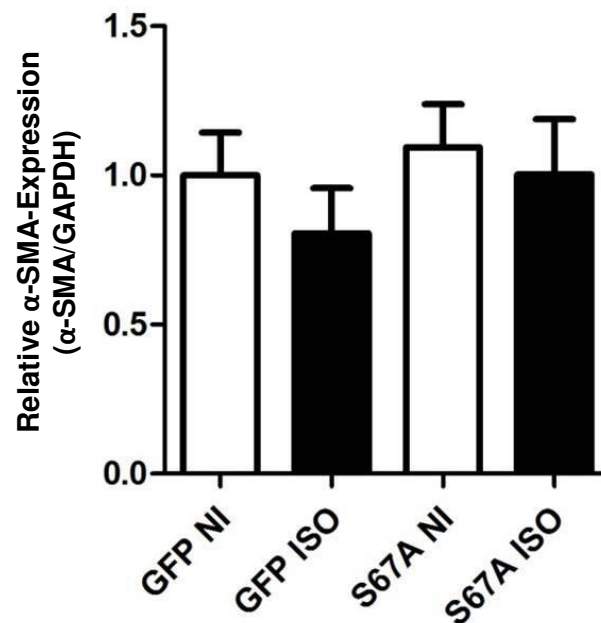


**Abbildung 17: Untersuchung von p-CREB nach akuter und chronischer  $\beta$ -AR-Stimulation in I-1S67A-überexprimierenden Zellen.** NRCF wurden nach Erreichen des Stadiums der Konfluenz für 3 h mit Ad-I-1S67A bzw. Ad-eGFP unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach 36 h Inkubation mit frischem virusfreiem Medium wurden die Zellen für weitere 10 min bzw. 24 h mit Isoprenalin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) Representative Immunoblots (B) Quantifizierung. Nach akuter Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg von p-CREB in den Ad-eGFP- und Ad-I-1S67A-transduzierten Zellen festgestellt werden ( $n=6\pm\text{SEM}$  aus 2 Präparationen). Der Probenumfang bei den Versuchen zur chronischen Stimulation beträgt  $n=12\pm\text{SEM}$  aus 3 Präparationen). Statistik: Zweistichproben-t-Test: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0.01$ .

### 5.3.3 Untersuchung von $\alpha$ -SMA nach Überexpression des Inhibitor-1

Aus den Kapiteln 5.2.3 – 5.2.5 der Arbeit geht hervor, dass die chronische Isoprenalin-stimulation keine Auswirkungen auf die  $\alpha$ -SMA-Expression in NRCF hat. Im Hinblick darauf wurde untersucht, ob der I-1 als Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in die Expression der profibrotischen Marker eingreift. Für die Versuche wurden NRCF der ersten und zweiten Passage verwendet. Nach adenoviraler Transduktion mit Ad-I-1S67A erfolgte eine Inkubation mit Isoprenalin für 24 h. Wie in Abbildung 18 zu erkennen, zeigt sich nach chronischer Isoprenalinstimulation in I-1-überexprimierten Fibroblasten kein Unterschied in der Expression von  $\alpha$ -SMA. Der Versuch bestätigt die Daten aus den Zellen ohne Virustransduktion. In Abschnitt 5.2.3 wurde anhand chronisch Isoprenalin-stimulierter Fibroblasten mit endogenem I-1 gezeigt, dass die  $\alpha$ -SMA-Expression konstant blieb. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass die chronische Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs keine Veränderung der  $\alpha$ -SMA-Expression herbeiführt. Auch eine Verstärkung durch eine vermehrte Expression von I-1S67A und somit höhere Persistenz von PKA/PP-1-regulierten Phosphorylierungen hatte diesbezüglich keine Auswirkung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der  $\beta$ -adrenerge Signalweg und somit auch der I-1 in Fibroblasten unter den vorliegenden Bedingungen keine bedeutende Rolle für die Regulierung der  $\alpha$ -SMA-Synthese spielt. Bei Vergleich der eGFP-Proben mit den I-1-Proben im Immunoblot sind keine Unterschiede hinsichtlich des  $\alpha$ -SMA-Signals auszumachen (Abb. 18).

**A**

**B**

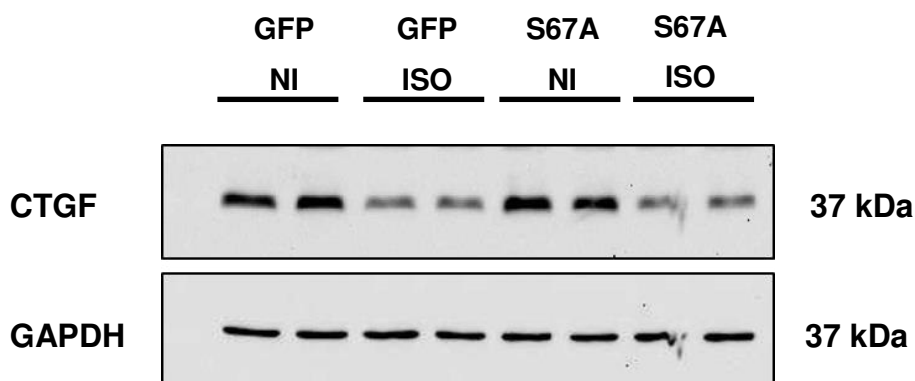
**Abbildung 18: Untersuchung von  $\alpha$ -SMA nach  $\beta$ -AR-Stimulation in I-1S67A-überexprimierenden Zellen.** NRCF wurden nach Erreichen des Stadiums der Konfluenz für 3 h mit Ad-I-1S67A und dem Kontrollvirus Ad-eGFP unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach 36 h Inkubation mit frischem virusfreiem Medium wurden die Zellen für weitere 24 h mit 1  $\mu$ mol Isoprenalin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) Immunoblot (B) Quantifizierung. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH ( $n=10 \pm \text{SEM}$  aus 3 Präparationen).

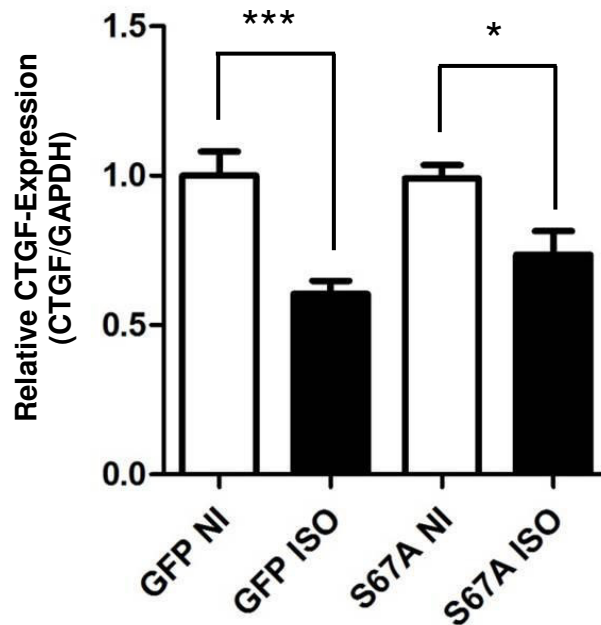
### 5.3.4 Untersuchung der intrazellulären CTGF-Spiegel nach Überexpression des Inhibitor-1

Für die Untersuchung von CTGF gelten die gleichen Überlegungen und Versuchsbedingungen wie zuvor in Abschnitt 5.3.3 beim  $\alpha$ -SMA. Im ersten Teil der Arbeit in Abschnitt 5.2.6 und 5.2.7 konnte eine Reduktion der CTGF-Synthese nach chronischer Isoprenalinstimulation gezeigt werden. Die Ad-GFP-transduzierten Proben repräsentieren mit Einschränkungen das gleiche Versuchsprinzip und liefern ähnliche Daten wie die nicht transduzierten Zellen zuvor. Auch hier wurde eine Abnahme der CTGF-Expression nach chronischer Isoprenalingabe in Bezug auf die eGFP-transduzierten

basalen Kontrollen festgestellt. Der Effekt war mit 40% ( $p < 0,001$ ) nicht ganz so deutlich wie zuvor bei den nicht-transduzierten Kulturen (66%). Beide Versuchsansätze können jedoch nicht uneingeschränkt miteinander verglichen werden, da durch den Zusatz der viralen Transduktion veränderte Kulturbedingungen geschaffen und die Zellen insgesamt länger in Kultur gehalten werden mussten. Aus vergangenen Publikationen ist zudem bekannt, dass eine eGFP-Überexpression Zellen unter Stress setzten und die Zellbiologie aus dem Gleichgewicht bringen kann, insbesondere die Transkriptionsvorgänge (Goto *et al.* 2003). Die Daten in Abbildung 19 zeigen, dass der I-1 scheinbar keine zusätzliche Suppression der CTGF-Synthese induziert. Weder basal noch unter chronischer Isoprenalinstimulation zeigt sich ein inhibierender Einfluss von I-1S67A auf die CTGF-Expression. In den Studien zur Transduktionseffizienz konnte demonstriert werden, dass unter basalen Bedingungen phosphoryliertes I-1S67A vorliegt, welches nach Isoprenalingabe durch vermehrte Expression mengenmäßig weiter ansteigt. Trotz dieser Tatsache war der CTGF-Gehalt in den unbehandelten I-1-transduzierten Zellen nahezu identisch zu dem in den unbehandelten Ad-eGFP-transduzierten Kontrollzellen. Einzig die Isoprenalinstimulation selbst bewirkte eine Reduktion der CTGF-Synthese unabhängig von der Präsenz von I-1. Daraus ergibt sich, dass die PKA/PP-1-Zielstrukturen, die durch I-1 in Fibroblasten reguliert werden, keinen Anteil am antifibrotischen Effekt einer  $\beta_2$ -AR-Aktivierung haben.

**A**



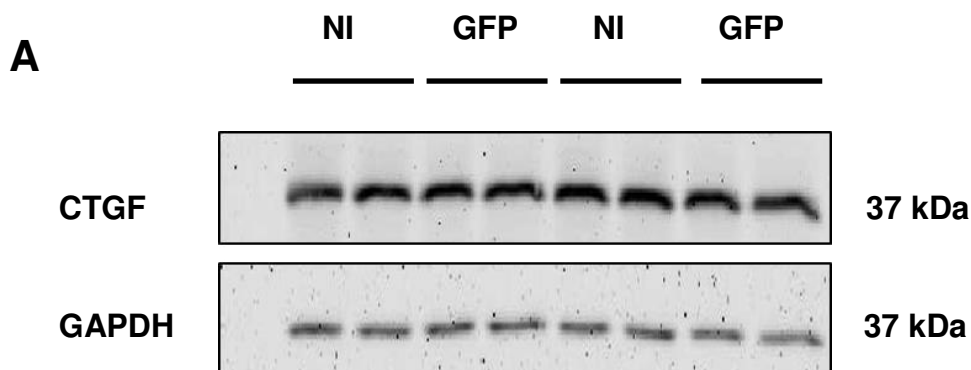
**B**

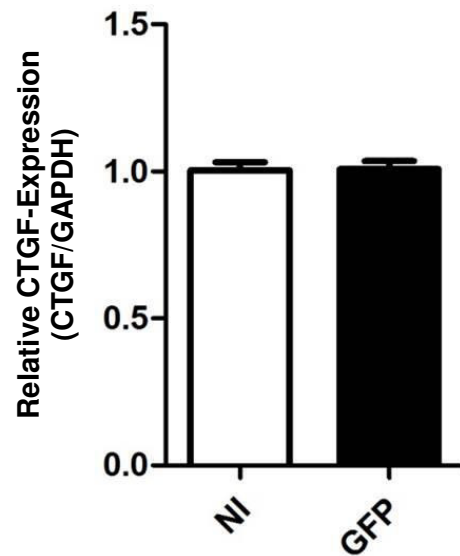
**Abbildung 19: Analyse von CTGF nach Überexpression des I-1S67A im Immunoblot.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz für 3 h mit Ad-I-1S67A bzw. mit dem Kontrollvirus Ad-eGFP unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach weiteren 36 h Inkubation mit frischem virusfreiem Medium wurden die Zellen für weitere 24 h mit Isoprenalin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) exemplarischer Immunoblot für die Detektion von CTGF (B) Quantifizierung. Der Probenumfang beträgt  $n=10 \pm \text{SEM}$  aus 3 Präparationen. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der CTGF-Synthese in den Ad-eGFP-transduzierten Kontrollen und den Ad-I-1S67A-transduzierten Zellen nach chronischer Isoprenalinstimulation im Zweistichproben-t-Test: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



#### 5.4 Auswirkungen der adenoviralen Transduktion und der eGFP-Expression auf die CTGF-Synthese

Da, wie oben erwähnt, ein Unterschied im Proteinexpressionsmuster für CTGF zwischen Ad-eGFP-transduzierten und nicht-transduzierten Fibroblasten nach chronischer Isoprenalinstimulation festgestellt wurde, wurde dann analysiert, ob die adenovirale Transduktion und folglich die massive Expression von eGFP direkte Auswirkungen auf die CTGF-Synthese hat. Dazu wurden Ad-eGFP-transduzierte und herkömmliche Fibroblasten ohne weitere Intervention auf ihre CTGF-Expression hin untersucht. Die Fibroblasten wurde für 3 h mit Ad-eGFP und anschließend für weitere 33 h in virusfreiem Medium inkubiert bis eine effektive Transduktion erreicht wurde. Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einer CTGF-Zunahme und Transduktion nachgewiesen werden. Der Transduktionsvorgang selbst bewirkt also keine Zu- oder Abnahme von CTGF. Da jedoch in den vorherigen Versuchen die Effekte nach chronischer Isoprenalinstimulation in GFP-transduzierten Zellen im Hinblick auf die CTGF-Expression geringer ausgefallen sind, liegt der Verdacht nahe, dass transduzierte Zellen weniger sensitiv auf eine  $\beta_2$ -AR-Stimulation reagieren.



**B**

**Abbildung 20: Auswirkungen der adenoviralen Transduktion auf die CTGF-Expression.** NRCF wurden nach Erreichen der Konfluenz für 3 h mit dem Ad-eGFP-Virus unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Als Kontrollen wurden unbehandelte NRCF herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. (A) Immunoblot (B) Quantifizierung. Der Probenumfang beträgt  $n=8 \pm \text{SEM}$  aus 2 Präparationen.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer chronischen Isoprenalinstimulation auf die Expression profibrotischer Markergene untersucht in An- und Abwesenheit des  $\beta$ -adrenergen Signalverstärkers I-1. Der Vergleich zwischen akuter (10 min) und chronischer (24 h) Stimulation zeigte einen initialen Anstieg der cAMP-Spiegel mit einer daraus resultierenden erhöhten Phosphorylierung des cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktors CREB, die beide nach 24 h nicht mehr nachweisbar waren. Trotzdem war diese initiale Aktivierung ausreichend um langfristig eine antifibrotische Wirkung zu entfalten. Dies konnte exemplarisch durch die Analyse des profibrotischen Markers CTGF in Fibroblasten demonstriert werden. Nach chronischer Isoprenalingabe kam es zu einer signifikanten Reduktion der CTGF-Synthese. Dagegen blieb das Expressionsniveau eines zweiten Markergens  $\alpha$ -SMA konstant. Auffällig waren die kultivierungsbedingten hohen Basalspiegel von CTGF und  $\alpha$ -SMA in den Fibroblasten. Dies entspricht nicht den physiologischen Verhältnissen, da beide Marker im Rahmen von fibrotischen Zuständen in größeren Mengen aufzufinden sind (Agarwal *et al.* 2006, Leask 2007). Innerhalb der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade existieren Mechanismen, welche die Transkription modulieren können. Dazu gehört unter anderem der I-1. Dieser fungiert als Verstärker in diesem System (El-Armouche *et al.* 2003). Anhand von p-CREB konnte gezeigt werden, dass das Phosphorylierungsniveau in der Zelle durch Einbringen des I-1 angehoben werden kann (Abb. 17). Eine Verstärkung des antifibrotischen Effektes ließ sich allerdings nicht nachweisen (Abb. 18 und 19). Weder die Expression von  $\alpha$ -SMA noch CTGF waren in Gegenwart des I-1 beeinflussbar. Einzig die Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade durch Isoprenalin mit der konsekutiven Generierung von cAMP war der entscheidende Faktor für diesen Effekt. Dies lässt sich anhand der Ergebnisse in den Abschnitten 5.2.6 und 5.3.4 herleiten. Durch chronische Isoprenalinstimulation wurde in Abschnitt 5.2.6 ein Rückgang der CTGF-Expression erreicht, welcher durch zusätzliches Einbringen des I-1 in Abschnitt 5.3.4 nicht weiter verstärkt werden konnte. Die Reduktion von CTGF war in diesem Fall auch auf die Inkubation mit Isoprenalin zurückzuführen.

### 6.1 Zellkulturbedingte Fibroblastentransformation

Das Wissen um die Myofibroblastentransformation in unbehandelten 2D-Fibroblastenkulturen war bereits vor den hier durchgeführten Versuchen bekannt und wurde auch schon in anderen Arbeiten und Publikationen thematisiert. Auf den ersten Blick klingt diese Beobachtung paradox, da Fibroblasten unter ruhenden Bedingungen bekanntermaßen keinen Anlass zur  $\alpha$ -SMA-Produktion haben. Sobald  $\alpha$ -SMA in hohen Konzentrationen detektiert werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass ein Phänotypenwechsel von Fibroblasten zu Myofibroblasten stattgefunden hat. Diese Entwicklung erfordert unter physiologischen Bedingungen einen bestimmten Stimulus. Ihr Erscheinen ist eng verknüpft mit Verletzungen des Bindegewebes und der nachfolgenden Wundheilung. Dabei spielen inflammatorische Mediatoren eine tragende Rolle (Baum und Duffy 2011). So sollen die Kontrollfibroblasten in Kultur eigentlich einen ruhenden Zustand simulieren, was allerdings in der praktischen Umsetzung nicht der Fall ist. Sobald Fibroblasten in zweidimensionalen Kulturen an die Plastik- oder Glasoberfläche adhäreren, wird der Vorgang des Phänotypenwechsels rasch eingeleitet. Schon nach kurzer Kultivierungszeit liegen die meisten Zellen in Form von differenzierten Myofibroblasten vor (Rohr 2011). Bereits 1990 machten Sappino und Kollegen die Entdeckung, dass humane Fibroblasten *in vivo* wenig Mikrofilamente bzw. Intermediärfilamente exprimieren und keine Kontakte untereinander ausbilden, während kultivierte Fibroblasten eine eher abgeflachte Form einnehmen, Stressfasern ausbilden und über *gap junctions* Verbindungen zu ihren Nachbarzellen aufbauen (Sappino *et al.* 1990). Die Expression und Rekrutierung von  $\alpha$ -SMA zu den Stressfasern in kultivierten Fibroblasten - der entscheidende Schritt bei der Umwandlung zu Myofibroblasten - geht laut Goffin und Kollegen (2006) auf die Ausbildung sogenannter superreifer Fokaladhäsionen zurück. Es handelt sich dabei um verankernde Zellverbindungen, welche die Stressfasern mit dem Schalenboden mechanisch verknüpfen und einen fünffach höheren mechanischen Stress als klassische Fokaladhäsionen ausüben. Zudem scheinen adhärierte Fibroblasten in der Folge vermehrt TGF- $\beta_1$  zu sezernieren und gleichzeitig die passenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu exprimieren mit der Konsequenz, dass sie auf autokrinem Wege ihren eigenen Phänotypenwechsel initiieren (Masur *et al.* 1996, Santiago *et al.* 2010, Rohr 2011). Auch die

unter Kulturbedingungen typische Hyperoxie provoziert die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und fördert somit die vermehrte Expression von  $\alpha$ -SMA (Roy *et al.* 2003; Rohr 2011). Dabei scheint auch die Dichte der Aussaat eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. So haben Masur und Kollegen festgestellt, dass die Differenzierung zu Myofibroblasten bei initial niedriger Aussaatdichte erleichtert wird (Masur *et al.* 1996), möglicherweise wegen der fehlenden Zell-Zellkommunikation. Diese Myofibroblastendifferenzierung in 2D-Zellkulturen ließ sich auch in den hier aufgeführten Versuchsreihen reproduzieren. Es wurde für die Kontrollfibroblasten stets eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -SMA festgestellt. Die quantitativen Ergebnisse im Western Blot (Abb. 9) und in der FACS-Analyse (Abb. 10) konnten in der Folge auch bildlich durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abb. 11) nach immunhistochemischer Aufbereitung untermauert werden. Letztendlich konnte dieser Umstand für die Untersuchung der antifibrotischen Eigenschaften der Isoprenalinstimulation und des cAMPs zunutze gemacht werden. So wurde durch die Bedingungen der Zellkultur bereits als Ausgangspunkt ein fibroseähnliches Stadium kreiert, ohne dass hierzu ein Eingriff von extern durch Zusatz spezifischer Stimuli wie z.B. TGF- $\beta_1$  erforderlich war. Bedingt durch den raschen Wechsel hin zu Myofibroblasten können die Erkenntnisse aus der Zellkultur nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragen werden. Die gängigen zweidimensionalen Zellkulturtechniken stellen bereits ein gestresstes System dar und simulieren daher vorwiegend den Zustand im kranken Herzen, sodass Rückschlüsse auf die Gegebenheiten im gesunden Herzen mit ruhenden Fibroblasten in einer 2D-Kultur nicht rekapituliert werden können. Diese Limitationen müssen natürlich bei der Beurteilung der Ergebnisse in dieser Arbeit Berücksichtigung finden. Aus diesem Grund müssen Schlussfolgerungen aus Versuchen ohne genaue Typisierung der Zellen kritisch hinterfragt werden. Andererseits muss auch hervorgehoben werden, dass die vorgegebenen Konditionen bewusst in Kauf genommen und genutzt werden können, um die Vorgänge im kranken Herzen besser zu verstehen.

Es existieren jedoch auch Möglichkeiten, um den physiologischen Zustand des gesunden Herzens *in vitro* zu simulieren. Ein Vorschlag zur Umsetzung wurde von der Arbeitsgruppe um Vozenin (1998) erarbeitet. Auch sie machten zuerst die Beobachtung, dass aus Schweinehaut isolierte Fibroblasten in zweidimensionaler Kultur anders als *in vivo* rasch proliferieren und sich wie aktivierte Fibroblasten mit Expression von

$\alpha$ -SMA verhalten, sogar im Stadium der Konfluenz. Zum Vergleich wurden die aus der gleichen Quelle isolierten Fibroblasten in komplexen dreidimensionalen Kulturmodellen aufgezogen, die den physiologischen Bedingungen im lebenden Gewebe am nächsten kommen. So konnte eine Normalisierung der Werte für  $\alpha$ -SMA erzielt werden. Ein weiterer Ansatz scheint die Herstellung sogenannter zweidimensionaler „Sandwich“-Kulturen zu sein, deren Besonderheit darin besteht, dass die Zellen ventral als auch dorsal in Gewebe-ähnlichen Strukturen eingebettet sind (Rohr 2011, Beningo *et al.* 2004). Durch Herstellung solcher Zellkulturen könnte zum Beispiel die Wirkung einer chronischen Isoprenalinstimulation auf ruhende Fibroblasten im gesunden Herzen als Gegenmodell untersucht werden.

### 6.2 $\beta_2$ -Rezeptor in Fibroblasten

In Abschnitt 5.1.3 wurde ein Versuch zur Typisierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in NRCF durchgeföhrt. Durch Blockade der  $\beta_2$ -Rezeptoren konnte der Phosphorylierungsstatus des I-1 nach vorheriger Isoprenalinverabreichung konzentrationsabhängig moduliert werden (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu hatte die  $\beta$ -adrenerge Stimulation nach Gabe eines  $\beta_1$ -Rezeptorblockers scheinbar überhaupt keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsniveau des I-1. Diese Konstellation lässt vermuten, dass die  $\beta$ -adrenerge Signalvermittlung bei der Phosphorylierung des I-1 in NRCF, die nach der Rezeptoraktivierung den Weg über cAMP und die Proteinkinase A nimmt, ausschließlich über den  $\beta_2$ -Rezeptor verläuft. Diese Erkenntnisse lassen sich bei Vergleich mit anderen Arbeiten scheinbar auch auf andere Spezies und Organe übertragen. So konnten Lamyel und Kollegen (2011) eindrucksvoll zeigen, dass humane Lungenfibroblasten lediglich mRNA-Transkripte für den  $\beta_2$ -Rezeptor exprimieren, nicht jedoch für  $\beta_1$ - oder  $\beta_3$ -Rezeptoren. Auch auf Proteinebene bot sich das gleiche Bild. Bereits 1980 unternahm die Arbeitsgruppe um Lau den Versuch die Rezeptorsubklassen auf Fibroblasten aus neonatalen kardialen Rattenfibroblasten durch Einsatz von Radioliganden zu typisieren (Lau *et al.* 1980). Sie machten die Entdeckung, dass neben den Kardiomyozyten weitere Zellformen im kardialen Gewebe existieren, die  $\beta$ -Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen und es sich dabei um  $\beta_2$ -Rezeptoren handelte. Im Laufe der Zeit

wurde diese Vermutung mehr und mehr bestätigt. Aktuelle Forschungen zu diesem Themengebiet von der Arbeitsgruppe um Aránguiz-Urroz (2011) an adulten kardialen Fibroblasten stehen ebenfalls im Einklang mit den Erkenntnissen aus dieser Arbeit. Ihnen gelang die  $\beta$ -adrenerg vermittelte Autophagie durch eine selektive  $\beta_2$ -Blockade aufzuhalten. Demgegenüber blieb eine  $\beta_1$ -Blockade ohne Wirkung.

### 6.3 $\beta$ -adrenerge Desensitivierung in Fibroblasten

In dieser Arbeit wurden NRCF über 24 h der Wirkung von Isoprenalin ausgesetzt, um die Auswirkungen erhöhter Katecholaminspiegel auf die Pathophysiologie von Fibroblasten zu erforschen. Vergleichbare Zustände mit erhöhten Katecholaminspiegeln finden sich im Rahmen der Herzinsuffizienz. Dabei ergaben sich als Begleiterscheinung Hinweise für das Vorhandensein von intrazellulären Desensitivierungsmechanismen. Durch Bestimmung der Parameter cAMP, p-CREB und p-I-1 konnte im Verlauf indirekt veranschaulicht werden, dass auch Fibroblasten ähnlichen Regulationsvorgängen wie Kardiomyozyten unterliegen. Im cAMP-Assay konnte nach 10-minütiger Isoprenalinstimulation eine Erhöhung des cAMP-Niveaus um mehr als 80% im Vergleich zum Basalniveau gemessen werden (Abb. 7). Die akute Stimulation des Rezeptors durch das Isoprenalin bewirkt über ein stimulierendes G-Protein die Aktivierung der AC, was den gefundenen Anstieg des cAMP-Spiegels erklärt. Nach einer chronischen Isoprenalinstimulation hingegen sank der cAMP-Spiegel im Assay um etwa 50% in Relation zur kurzzeitigen Stimulation. Der ermittelte Unterschied ist gut vereinbar mit dem Konzept einer Desensitivierung der  $\beta_2$ -AR-abhängigen Effektoraktivierung. Nach akuter Isoprenalinstimulation konnte ein Anstieg der Phosphorylierung im Western Blot um 139% (Abb.8) gleichsinnig zum cAMP festgestellt werden. Die cAMP-abhängige Phosphorylierung an der Stelle Serin 133 befähigt CREB zur Translokation in den Nukleus, wo er an den Promotor CRE bindet und die transkriptionale Aktivität fördert (Shaywitz und Greenberg 1999). Nach chronischer Isoprenalinstimulation hingegen fällt das Phosphorylierungsniveau in den Versuchen wieder auf das Basalniveau zurück. Somit stützt auch die Analyse von p-CREB im Western Blot die These

der  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung. Eine weitere Feststellung ist, dass sich die Desensitivierung nicht nur auf die Ebene des *second messengers* cAMP beschränkt, sondern auch weiter in der Signalkaskade – in diesem Fall – bis zu dem Phosphoprotein CREB auswirkt. Im Unterschied zum p-CREB (Abb. 8) wurden zum Endzeitpunkt der chronischen Stimulation weiterhin cAMP-Spiegel über dem Basalniveau registriert (Abb. 7). Die Diskrepanz kann wiederum ein Zeichen dafür sein, dass die Desensitivierung auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade greift und noch andere Signaltransduktionswege unabhängig von cAMP in die Regulierung von p-CREB involviert sind. So besteht in Kardiomyozyten zum Beispiel die Möglichkeit einer Aktivitätszunahme der Proteinphosphatasen mit einer Dephosphorylierung der Effektorproteine (Wittköpper *et al.* 2011). Das Absinken des cAMP-Spiegels im Assay und die gleichzeitig verminderte Phosphorylierung von CREB im Immunoblot nach chronischer Isoprenalinstimulation im Vergleich zu der akuten Stimulation sind jedoch insgesamt sehr gut miteinander vereinbar im Kontext der  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung. Auch anhand der gezeigten transienten Phosphorylierung des I-1 (Abb. 16) können gleichermaßen Rückschlüsse auf die Desensitivierung gezogen werden. Analog zum p-CREB konnte nach chronischer Isoprenalinexposition kein sicherer Anstieg des phosphorylierten I-1 in Relation zu den Basalwerten verzeichnet werden. In den chronisch stimulierten Zellen war die absolute Menge an phosphoryliertem I-1 zwar angestiegen, dies war aber größtenteils auf die isoprenalinbedingte CMV-Promotoraktivierung des eingebrachten adenoviralen Konstruktes zurückzuführen. Entscheidend war, dass sich das Verhältnis von p-I-1 zu Gesamt-I-1 nach chronischer Stimulation unverändert darstellte (Abbildung 16 B). Die Phosphorylierung des I-1 folgt dabei den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie beim p-CREB und geschieht ebenfalls cAMP-abhängig. Dies führt zu der Annahme, dass durch das Absinken des cAMP-Spiegels infolge der Desensitivierung eine Phosphorylierung des I-1 ausbleibt bzw. aufgehoben wird.

In Kardiomyozyten ist die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung schon länger bekannt und wird als adaptiver Schutzmechanismus interpretiert (El-Armouche *et al.* 2008). Insbesondere scheinen in den Herzmuskelzellen die  $\beta_1$ -Rezeptoren diesem Mechanismus zu unterliegen. In diesem Zusammenhang wurde die chronische Exposition der Zelle gegenüber erhöhten Katecholaminspiegeln im Rahmen einer Herzinsuffizienz als Ursa-



che für die Schutzmaßnahme identifiziert. Indirekt lässt sich die Desensitivierung anhand sogenannter Phosphoproteine, die meist Zwischenprodukte einer Signalkaskade darstellen, nachvollziehen. Die Drosselung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion lässt eine Senkung des Phosphorylierungsniveaus in der Zelle aufgrund einer Aktivitätsminderung der Proteinkinase A oder Steigerung von Phosphatasen erwarten. Praktisch gezeigt wurde dies in Kardiomyozyten zum Beispiel anhand des Regulatorproteins Phospholamban (El-Armouche *et al.* 2004). Fibroblasten wurden diesbezüglich noch nicht näher untersucht. Es konnten bereits mehrere Mechanismen entdeckt werden, die zum Phänomen der Desensitivierung beitragen. Maßgeblich hierfür ist zum einen die Phosphorylierung des  $\beta$ -AR, welche durch die G-Protein-Rezeptorkinase (GRK bzw.  $\beta$ -ARK) katalysiert wird (Hausdorff *et al.* 1990). Aber auch die Proteinkinase A kann eine Phosphorylierung des Rezeptors nach ihrer Aktivierung durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation vornehmen. Das bedeutet, dass die Zelle über ein Rückkopplungsmechanismus verfügt, um eine unkontrollierte Signalweiterleitung zu verhindern. Die Phosphorylierung sorgt neben der Entkopplung des Rezeptors für eine Affinitätsabnahme und ist gleichzeitig eine Voraussetzung für die Internalisierung des Rezeptors (Wallukat 2002, Sibley *et al.* 1987). Man weiß, dass bereits nach wenigen Minuten im Zuge erhöhter Katecholaminspiegel eine Sequestration des Rezeptors weg von der Zelloberfläche in eine vesikuläre Fraktion im Zellinnern erfolgt. In einem Zeitraum von Stunden folgt der anfänglichen Internalisierung dann eine Herabsetzung des gesamten Rezeptorkontingents (Suzuki *et al.* 1992). Bei einer chronisch adrenergen Stimulation ist als Langzeitfolge sogar eine Downregulation des Rezeptors, bedingt durch eine erniedrigte Expression auf mRNA- und Proteinebene, möglich (Wallukat 2002). In Kardiomyozyten betrifft dies im Rahmen der Herzinsuffizienz selektiv den  $\beta_1$ -AR (Bristow *et al.* 1986). In anderen Organsystemen und Geweben ist eine Downregulation des  $\beta_2$ -Rezeptors bekannt. So gelang es Suzuki und Kollegen in Experimenten an Hamsterfibroblasten eine Herunterregulation von  $\beta_2$ -Rezeptoren nachzuweisen (Suzuki *et al.* 1992). Dazu wurden Hamsterfibroblasten mit cDNA, die für beide Rezeptorsubtypen kodiert, transfiziert. Die Daten aus ihren Studien weisen auch darauf hin, dass die Herunterregulation des  $\beta_2$ -Rezeptors sogar wesentlich schneller erfolgt und mit höherer Amplitude einhergeht als im Falle der  $\beta_1$ -Rezeptoren. Die Isoprenalinein-

wirkzeit von 24 h in dieser Arbeit könnte ausreichen, um in das Rezeptorexpressionsmuster der Zelle einzugreifen. Jedoch ist eine Desensitivierung durch die Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Rezeptors mit den Folgeerscheinungen als Hauptursache am wahrscheinlichsten. Dieser Effekt wurde bereits 1988 durch Bouvier und Kollegen auch im Hinblick auf die Eintrittszeit näher untersucht (Bouvier *et al.* 1988). Sie konnten darlegen, dass die 15-minütige Inkubation von  $\beta_2$ -Rezeptor-exprimierenden Fibroblasten mit Isoprenalin zu einer signifikanten Reduktion des Rezeptorbestands führt und mit einer zunehmenden Phosphorylierung der Rezeptoren assoziiert ist. Die verschiedenen Möglichkeiten der Rezeptormodulation wurden in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Letztendlich kann anhand der vorliegenden Daten nur eine Aussage darüber getroffen werden, dass eine Desensitivierung wahrscheinlich ist, jedoch nicht wie sie zustande kommt. Über eine transkriptionelle Modulation kann daher nur spekuliert werden. Dies könnte man durch Anwendung von Bindungsstudien prüfen.

In Kardiomyozyten wird die Desensitivierung als protektiv und vorteilhaft gewertet. Ob und welche Vorteile sich durch die Desensitivierung in Fibroblasten ergeben, muss in Zukunft näher untersucht werden.

### **6.4 Antifibrotische Effekte von cAMP**

#### **6.4.1 Rezeptorvermittelte und -unabhängige Möglichkeiten zur Erhöhung des cAMP-Spiegels**

Es existieren verschiedene Möglichkeiten einen cAMP-Anstieg zu forcieren, um eine antifibrotische Wirkung zu erzielen. In dieser Arbeit erfolgte die Intervention rezeptorvermittelt durch den Einsatz des selektiven  $\beta$ -Agonisten Isoprenalin, welcher sowohl an  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren bindet (van Harmelen 1997). Dieselbe Methode mit ähnlicher Wirkung findet sich auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten. In aktuelleren Veröffentlichungen wurde die inhibierende Wirkung  $\beta$ -adrenerger Substanzen auf die Kollagensynthese in pulmonalen Fibroblasten beschrieben (Liu *et al.* 2010). Durch Einsatz cAMP-steigernder Substanzen ist es gelungen eine Inhibition der TGF- $\beta_1$ -induzierten CTGF-Expression in embryonalen Mausfibroblasten

herbeizuführen. Auch die Studien von Laymel und Kollegen basieren auf dem gleichen Prinzip (Laymel *et al.* 2011). Durch Applikation der  $\beta_2$ -selektiven Substanzen Formoterol und Olodaterol konnte nachweislich die Kollagensynthese und  $\alpha$ -SMA-Expression in humanen Lungenfibroblasten inhibiert werden.

Ergänzend sollte noch erwähnt werden, dass generell eine Aktivierung von  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren in Fibroblasten mit antifibrotischen Effekten assoziiert zu sein scheint (Chow *et al.* 2012). Es wurden noch weitere Signalwege neben der  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade identifiziert, welche mittels  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren einer Fibrose entgegenwirken können. So konnte zum Beispiel in Nierenfibroblasten vom Menschen sowie von Nagetieren gezeigt werden, dass das Hormon Relaxin über eine Inhibierung der Phosphorylierung von Smad2 die Aktivität von TGF- $\beta_1$  beschränkt und die Myofibroblastendifferenzierung aufhält (Chow *et al.* 2012). Relaxin wirkt dabei über den Rezeptor RXFP1, der an ein  $G\alpha_s$ -Protein gekoppelt ist. Auch die Studien an Lungenfibroblasten von Huang und Kollegen sollten in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben. Prostaglandin  $E_2$  wirkt nach Bindung an den  $G\alpha_s$ -gekoppelten EP2-Rezeptor mit nachfolgendem Anstieg von cAMP inhibierend auf die Kollagensynthese und die Fibroblastenproliferation (Huang *et al.* 2008).

Während in diesen Arbeiten der cAMP-Anstieg indirekt über die Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren herbeigeführt wurde, wurde dies in der Arbeitsgruppe Kothapalli durch direkten Eingriff in die cAMP-Homöostase mittels Forskolin erreicht. Es handelt sich bei Forskolin um einen nichtselektiven Aktivator der Gruppe der Adenylylcyclasen. Auch das IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) konnte ein ähnliches antifibrotisches Potenzial mit Reduktion der CTGF-Synthese entfalten. IBMX besitzt die Fähigkeit unselektiv Phosphodiesterasen zu inhibieren und so den Abbau von cAMP zu verhindern. Die Arbeitsgruppe Duncan (1999) konnte daran anknüpfend einerseits demonstrieren, dass die TGF- $\beta_1$ -induzierte Kollagensynthese in NRK (*normal rat kidney*) Fibroblasten und humanen Fibroblasten der Vorhaut (HFF) durch CTGF vermittelt wird. Andererseits ist es ihnen anschließend gelungen durch Erhöhung des cAMP-Spiegels mittels cAMP-Analoga wie 8-Br-cAMP die TGF- $\beta_1$ -induzierte Genexpression von CTGF zu blockieren. In der Folge konnte auch nachgewiesen werden, dass die CTGF-vermittelte Kollagensynthese im Zuge des

cAMP-Anstiegs rückläufig war. In unserer Arbeitsgruppe wiederum wurde beispielsweise ein Anstieg der profibrotischen Parameter CTGF und  $\alpha$ -SMA in PDE2A-überexprimierenden NRCF festgestellt. Die PDE2A ist eine der Phosphodiesterasen, welche die Eigenschaft besitzen cAMP abzubauen. Bei Überexpression sorgt sie für eine deutliche cAMP-Suppression, was die vermehrte Expression der profibrotischen Parameter erklärt (Vettel und Lämmle *et al.* 2014). Eine vermehrte Expression der PDE2 wird in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz als Teil des adaptiven Schutzmechanismus interpretiert. Dieser Mechanismus tritt reaktiv nach  $\beta$ -adrenerger Überstimulation im Rahmen der  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung auf (Mehel *et al.* 2013). Zusammenfassend lässt sich demnach schlussfolgern, dass sowohl durch rezeptorvermittelte als auch rezeptorunabhängige Verfahren eine ähnliche antifibrotische Wirkung erzielt werden kann. Gemein ist ihnen die Anhebung des cAMP-Niveaus, was als gemeinsame Schnittstelle betrachtet werden kann.

### 6.4.2 Herunterregulation von CTGF

Ein Themenschwerpunkt dieser Arbeit befasste sich mit der Auswirkung einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation auf die profibrotischen Parameter CTGF und  $\alpha$ -SMA. Die Immunoblot-Analyse nach einer 24 h andauernden Isoprenalinstimulation der NRCF ergab eine Reduktion von CTGF um mehr als 60% im Vergleich zu einer unbehandelten Referenzkultur (Abb.12). Die deutliche Herunterregulation von CTGF konnte auch fluoreszenzmikroskopisch nach immunhistochemischer Färbung erfasst werden (Abb.13). Die Kontrollzellen wiesen bereits ein hohes Expressionsniveau für CTGF auf. Neben den hohen  $\alpha$ -SMA-Spiegeln bestätigen diese Befunde den erwähnten kultivierungsbedingten Phänotypenwechsel von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Leask und Abraham 2003). CTGF ist nicht nur entscheidend an der Zusammenstellung der extrazellulären Matrix (Frazier *et al.* 1996) beteiligt, sondern fördert auch die Proliferation von Fibroblasten und unterstützt ihre Umwandlung zu Myofibroblasten (Grotendorst *et al.* 2004). Unter Berücksichtigung dessen lässt sich also konstatieren, dass eine  $\beta$ -adrenergen Stimulation die CTGF-Expression in bereits differenzierten Myofibroblasten deutlich supprimieren kann. Grund dafür ist mit großer Wahrschein-

lichkeit der in Folge der Rezeptoraktivierung resultierende cAMP-Anstieg, dem nachgewiesenermaßen antifibrotische Eigenschaften zugeschrieben werden (Insel *et al.* 2012). Am Anfang dieser Kette steht die Aktivierung eines  $G\alpha_s$ -gekoppelten-Rezeptors, welche die weitere Reaktion in Gang setzt. Das Ergebnis ist eine Unterdrückung der CTGF-Expression in Fibroblasten (Swaney *et al.* 2005, Daniel *et al.* 2009). Auch der Transkriptionsfaktor CREB scheint in diese Prozesse involviert zu sein. Die Phosphorylierung von CREB wird in Verbindung mit antifibrotischen Ereignissen gebracht. Chan *et al.* (2010) machten die Beobachtung, dass eine vermehrte Phosphorylierung von CREB durch Anstieg von cAMP mit einer Verminderung der Kollagensynthese assoziiert ist. Die intrazelluläre Akkumulation von cAMP wurde dabei durch Einsatz von Prostazyklin induziert. Phosphoryliertes CREB scheint die TGF- $\beta_1$ -vermittelten Effekte zu antagonisieren, indem es mit um den essentiellen transkriptionalen Coaktivator CBP/p300 des TGF- $\beta_1$ /Smad-Signalweges konkurriert. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass auch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation eine Phosphorylierung von CREB über cAMP zur Folge hat (Abb.8). Bei anhaltender  $\beta$ -adrenerger Stimulation kommt es allerdings durch die sinkenden cAMP-Spiegel wieder zu einer Desphosphorylierung bis das Basalniveau wieder erreicht wird (Abb. 8). Daraus kann man schließen, dass anfangs bei hohem Phosphorylierungsgrad des CREB der antifibrotische Effekt zur Geltung kommt und bei chronischer  $\beta$ -adrenerger Simulation zunehmend abgeschwächt wird. Um dies zu belegen, müssten die chronischen Stimulationsversuche über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und dabei die Phosphorylierung von CREB im Verlauf der chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation in Beziehung zur Kollagensynthese gesetzt werden. Mit der Quantifizierung der zellulären cAMP-Assays (Abb. 7) konnte veranschaulicht werden, dass auch nach chronischer Isoprenalinstimulation immer noch erhöhte cAMP-Spiegel im Lysat vorzufinden waren, die sich jedoch aufgrund der Desensitivierung deutlich unter den Werten der akuten Isoprenalinstimulation einreichten. Vermutlich ist insbesondere der hohe initiale cAMP-Anstieg, der im Assay nach akuter Isoprenalinstimulation erfasst werden konnte, maßgeblich an der CTGF-Suppression beteiligt und wird durch die im Verlauf leicht erhöhten cAMP-Spiegel aufrechterhalten. Das lässt die Interpretation zu, dass die cAMP-Wirkung auch bei länger bestehender Isoprenalinstimulation anhält. Kothapalli und Kollegen (1998) machten ähnliche Entdeckung bezüglich der Herunterregulation von CTGF durch

cAMP (Kothapalli *et al.* 1998). Zudem scheint es sich bei den cAMP-vermittelten Effekten nicht um ein organspezifisches Phänomen zu handeln, da sie auch in der Lunge (Liu *et al.* 2010), der Haut oder in der Niere (Duncan *et al.* 1999) beobachtet wurden. Interessant wäre es herauszufinden, ob sich die nachgewiesene CTGF-Suppression auch in den NRCF erwartungsgemäß auf die Kollagensynthese niederschlägt, sodass spezie- und organübergreifende Vergleiche gezogen werden können. Wissenswert wäre zudem, welche Langzeitfolgen die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung auf die CTGF-Produktion hat. Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die langfristig erniedrigten cAMP-Spiegel auf die CTGF-Expression auswirken. Eine mögliche Antwort liefern die Ergebnisse aus der PDE2-Überexpression in Fibroblasten der Arbeitsgruppe Vettel und Lämmle. Die daraus resultierende cAMP-Suppression bewirkte automatisch einen Anstieg der CTGF-Synthese auch ohne zusätzliche profibrotische Stimuli (Vettel und Lämmle *et al.* 2014). Nach 24 h waren die cAMP-Spiegel in den hier durchgeführten Versuchen anscheinend trotz Desensitivierung noch ausreichend hoch (Abb. 7) um die CTGF-Synthese zu unterdrücken. Eventuell müssten die gleichen Parameter nach noch längerer Inkubationszeit betrachtet werden, um zu ermitteln, ob die CTGF-Werte eventuell wieder ansteigen und sich dem Basalniveau nähern, zumal es sicherlich eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, bis sich eine cAMP-Konzentrationsänderung auf die CTGF-Synthese auswirkt.

### 6.4.3 Auswirkung von cAMP auf die Expression von $\alpha$ -SMA

Anders als beim CTGF konnte nach chronischer Isoprenalinstimulation keine Veränderung des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA in den NRCF beobachtet werden. Sowohl die Immunoblot-Analyse (Abb. 9) als auch die FACS-Messung (Abb. 10) ergaben keinen Unterschied zwischen Referenzkultur und chronisch Isoprenalin-stimulierten Fibroblasten. Auch die immunhistochemischen Färbungen (Abb 11) lieferten keine Anzeichen für eine Veränderung von  $\alpha$ -SMA. In anderen Arbeiten konnte demonstriert werden, dass ein cAMP-Anstieg eine  $\alpha$ -SMA-Expression behindern kann und folglich durch eine Konversionshemmung von Fibroblasten zu Myofibroblasten antifibrotisch wirkt. Swaney *et al.* (2005) berichten über eine Inhibition der  $\alpha$ -SMA-Expression in TGF- $\beta_1$ -stimulierten adulten kardialen Fibroblasten durch Einsatz von Forskolin und

cAMP-Analoga. In Gegenwart hoher cAMP-Spiegel kommt also die Wirkung des TGF- $\beta_1$  nicht wie gewohnt zur Geltung, sodass ein Phänotypenwechsel verhindert wird. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kolodsick *et al.* (2003), als sie mittels Prostaglandin E<sub>2</sub> die TGF- $\beta_1$ -induzierte  $\alpha$ -SMA-Expression in neonatalen und adulten Lungenfibroblasten unterdrücken konnten. Es wurde folglich die Entstehung der Fibrose trotz des Stimulus verhindert. Im Unterschied zu den genannten Arbeitsgruppen wurde in dieser Arbeit der cAMP-Effekt an bereits transformierten Myofibroblasten, die ein hohes basales  $\alpha$ -SMA-Signal aufwiesen, überprüft. Da eine Transformation bereits vor Beginn der Interventionsversuche größtenteils stattgefunden hatte, wurde auf einen zusätzlichen spezifischen Stimulus wie die externe Applikation von TGF- $\beta_1$  verzichtet. Es ist davon auszugehen, dass ohnehin zellkulturbedingt große Mengen des Zytokins durch die Fibroblasten selbst ausgeschüttet wurden (Masur *et al.* 1996; Santiago *et al.* 2010; Rohr 2011). Unter diesen Umständen konnte keine Konversion von Myofibroblasten zurück zu ruhenden Fibroblasten durch die Anwesenheit von cAMP verzeichnet werden. Die Fibrose im Sinne der  $\alpha$ -SMA-Expression zeigte sich also als nicht reversibel. Zumal in der Literatur beschrieben ist, dass bereits transformierte Fibroblasten aufgrund einer Herunterregulation von Adenylylcyclase bei gleichzeitiger Hochregulation der PDEs in der Folge schlechter auf cAMP-steigernde Stimuli ansprechen (Lu *et al.* 2013). Dies bedeutet, dass cAMP präventiv eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten unter den vorliegenden Bedingungen aufhalten kann, jedoch nur eingeschränkt eine Rekonversion zu Fibroblasten bewirkt. Darüber hinaus muss festgehalten werden, dass die Fibroblasten im Rahmen dieser Arbeit einer chronischen Isoprenalinstimulation ausgesetzt waren, die nachweislich aufgrund der Desensitivierung eine Absenkung der cAMP-Spiegel unter Maximalniveau zur Folge hatte. Möglicherweise wurde aufgrund dessen keine ausreichend hohe cAMP-Konzentration mehr generiert, um einen Rückgang von  $\alpha$ -SMA zu erreichen bzw. eine mögliche Suppression dieses Markers aufrechtzuerhalten, anders als dies beim CTGF der Fall war. Denn nichtsdestoweniger gibt es Hinweise, dass ausreichend hohe cAMP-Spiegel zusätzlich in der Lage sind, eine Konversion zu Myofibroblasten wieder rückgängig zu machen, also auch hohe  $\alpha$ -SMA-Expressionen wieder zu senken, so gezeigt durch Lu *et al.* (2013). Die Arbeitsgruppe erzeugte die cAMP-vermittelte Abnahme von

$\alpha$ -SMA in adulten kardialen Rattenfibroblasten mittels Forskolin und dem PKA-Analogen N<sup>6</sup>-phenyladenosine-cAMP, also nicht wie hier über eine Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, und umgehen somit eine mögliche  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung. Außerdem wurden in derselben Arbeit von Lu *et al.* Forskolin, ein unspezifischer Aktivator der AC, und Isoprenalin bezüglich ihrer Fähigkeit das cAMP-Niveau anzuheben verglichen. Dabei erwies sich Forskolin als deutlich potenter in dieser Hinsicht. Dieser Aspekt könnte ein zusätzlicher Faktor dafür sein, dass in den Versuchen keine Herunterregulation von  $\alpha$ -SMA beobachtet werden konnte. In humanen Lungenfibroblasten konnte jedoch auch schon gezeigt werden, dass durch Einsatz  $\beta$ -adrenerger Substanzen anscheinend eine Suppression von  $\alpha$ -SMA möglich ist. So erreichten Laymel *et. al* (2011) durch Verwendung der spezifischen  $\beta_2$ -AR-Agonisten Formoterol und Olodaterol eine signifikante Verminderung der  $\alpha$ -SMA-Expression. Im Unterschied dazu ist Isoprenalin ein unselektiver  $\beta_{1/2}$ -AR-Aktivator. Es handelt sich hierbei durchaus um Substanzen mit ähnlichem Wirkprofil, allerdings sind Unterschiede in der Signalweiterleitung nicht auszuschließen. Interessant wäre es zu wissen, ob ähnliche Versuchsergebnisse in der Arbeitsgruppe Laymel auch unter Einsatz von Isoprenalin erzielt worden wären. Insgesamt bleibt die Vergleichbarkeit beider Versuchsreihen eingeschränkt, da es sich um Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft (adulte humane Fibroblasten aus der Lunge vs. Neonatale Rattenfibroblasten aus dem Herzen) handelt. Die Ergebnisse aus der hier vorliegenden Arbeit sind hingegen sehr gut vereinbar mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe Liu *et al.* (2006). Auch sie behandelten adulte kardiale Rattenfibroblasten 24 h lang mit Isoprenalin unter ähnlichen Bedingungen und konnten zunächst keinen Rückgang von  $\alpha$ -SMA verzeichnen. Parallel dazu wurden Fibroblasten für 48 h mit TGF- $\beta_1$  stimuliert und anschließend einer 24 h andauernden Isoprenalinbehandlung unterzogen. Erst hier wurde der antifibrotische Effekt der  $\beta$ -adrenergen Stimulation sichtbar, da eine zusätzliche  $\alpha$ -SMA-Expression durch TGF- $\beta_1$  inhibiert werden konnte. So lässt sich zusammenfassen, dass auch in ihren Versuchen eine lang andauernde Isoprenalinbehandlung keinen ausreichenden Stimulus darstellte, um eine Umwandlung von Myofibroblasten zurück zu Fibroblasten herbeizuführen, aber es im Gegensatz dazu die fibrotischen Effekte von TGF- $\beta_1$  antagonisieren konnte und somit ein weiteres Fortschreiten der Fibrose im Herzen aufhält.



Der Grund dafür könnte neben der oben diskutierten Desensitivierung der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren mit einem Absinken der cAMP-Spiegel auch in der Wahl des  $\beta$ -Agonisten liegen. Es bleibt offen, ob Isoprenalin potent genug ist, um eine maximal antifibrotische Wirkung unter diesen Kulturbedingungen zu entfalten. Interessant wäre ein Vergleich von Isoprenalin mit dem Adenylylcyclase-Aktivator Forskolin oder dem PKA-Analogen N<sup>6</sup>-phenyladenosine-cAMP unter den gleichen Versuchsbedingungen. Jedoch geht von einer chronischen Isoprenalinstimulation anscheinend trotzdem eine milde antifibrotische Wirkung aus, sichtbar an der Herunterregulation von CTGF. Diese könnte eventuell mit einer verminderten Syntheseaktivität der Myofibroblasten zusammenhängen. Insgesamt muss man aber zusammenfassen, dass der antifibrotische Effekt einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in bereits transformierten Myofibroblasten eher eine untergeordnete Rolle spielt. Dafür spricht zum Beispiel die Tatsache, dass Beta-Blocker wie Carvedilol oder Propranolol in der Therapie der Herzinsuffizienz das fibrotische Remodeling nicht weiter vorantreiben.

### 6.4.4 Potenzielle Auswirkung von cAMP auf die Gesamtproteinmenge

Eine weitere interessante Feststellung war, dass in den chronisch stimulierten Fibroblasten stets eine niedrigere Proteinkonzentration gemessen wurde als in den unbehandelten Referenzkulturen. Insgesamt wurde eine um 10% verminderte Menge ermittelt (Abb. 14). Dies könnte ebenfalls mit einer Erhöhung des cAMP-Spiegels zusammenhängen, welche nicht nur die EZM-Produktion der Fibroblasten einschränkt, sondern zudem auf der einen Seite ihre Proliferation hemmt und auf der anderen Seite den Zelltod fördert (Insel *et al.* 2012). In einigen Veröffentlichungen wurde die Senkung der Fibroblastenzahl nach cAMP-Anstieg bereits thematisiert (Duncan *et al.* 1999, Kothapalli *et al.* 1998). Hier stellt sich wieder die Frage, ob die Desensitivierung mit einer cAMP-Abnahme diesen Effekt limitiert, da eine Proteinabnahme von 10% nicht sehr ausgeprägt ist. Möglicherweise ließe sich der Effekt noch deutlicher in serumhaltigem Medium veranschaulichen. Die Intervention mit Isoprenalin wurde stets in serumfreien Medium durchgeführt. Außerdem müsste in Zukunft geklärt werden, ob die Reduktion der Proteinmenge tatsächlich auf einen cAMP Anstieg und damit einer Proliferationsabnahme zurückzuführen ist, indem man zusätzlich die Fibroblastenzahl

bestimmt und auch Proliferationsassays durchführt. So kann die Verschiebung in der Proteinmenge als Hinweis auf eine Proliferationshemmung gedeutet werden, beweist diese aber nicht.

### 6.5 Die Rolle des Inhibitor-1 in NRCF

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass der  $\beta$ -adrenerge Signalweg durch cAMP-Anstieg an der Regulation profibrotischer Parameter wie CTGF beteiligt ist. Die Überlegung war anschließend den I-1, der als ein Verstärker des  $\beta$ -adrenergen Signalweges identifiziert werden konnte (El-Armouche *et al.* 2003), als Werkzeug durch Überexpression einzusetzen, um seine Rolle im Rahmen der Fibrose näher zu analysieren. Bezüglich des  $\alpha$ -SMA sollte überprüft werden, ob durch Zuhilfenahme des I-1 eine Suppression schlussendlich möglich ist, was zuvor durch eine  $\beta$ -adrenerge Aktivierung des Rezeptors nicht gelang (Abb. 9). Bisher wurden noch keine Untersuchungen hinsichtlich der Funktion des I-1 in Fibroblasten vorgenommen. So gibt es auch kaum Informationen über das endogene Vorkommen dieses Proteins in den Fibroblasten der unterschiedlichen Spezies. Im gesunden Herzen ist der I-1 eher in geringen Mengen vorzufinden (Wittköpper 2011). Welchen Anteil dazu die Fibroblasten beisteuern ist noch nicht erforscht. Die Überexpression des I-1 muss durch seine Fähigkeit die Protein-Phosphatase-1 zu inhibieren dementsprechend in erster Linie als Verstärkung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs verstanden werden.

Die Interpretation der Versuchsergebnisse rund um den I-1 in kardialen Fibroblasten gestaltet sich insgesamt schwierig. Unter den gewählten Kultur- und Versuchsbedingungen sind typische bereits bekannte Besonderheiten in Erscheinung getreten, die eine Übertragung der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation *in vivo* nur eingeschränkt möglich machen. So reagierten die adenoviral transformierten Fibroblasten weniger sensitiv auf die akute und chronische Isoprenalinstimulation. CTGF konnte nach chronischer Isoprenalinstimulation nicht in gleichem Ausmaß herunterreguliert werden wie in den nicht-transduzierten Fibroblastenkulturen (63% in den nicht-transduzierten vs. 40% in den transduzierten Zellen, Abb. 12 und 19). Auch die Anhebung des Phosphorylierungsniveaus von CREB nach akuter Stimulation ist in den

eGFP-transduzierten Zellen deutlich niedriger ausgefallen (139% in den nicht-transduzierten vs. 40% in den transduzierten Zellen, Abb. 8 und 17). Ein Vergleich eGFP-transduzierten Fibroblasten mit einer nicht-transduzierten Kontrollkultur ergab, dass die eGFP-Überexpression keinen direkten Einfluss auf die CTGF-Synthese der Fibroblasten hat (Abb 20), sondern stattdessen eher die Wirkung von Isoprenalin durch störende Interaktion nicht in vollem Ausmaß zur Entfaltung kommen lässt. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass eGFP-transduzierte Zellen nur eingeschränkt zur Einschätzung der Sensitivität von Substanzen geeignet sind. Beispielsweise konnte in humanen Neuroblastomazelllinien eine vermehrte Sensitivität gegenüber Zytostatika nach eGFP-Transduktion festgestellt werden. Grund hierfür ist die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch eGFP, welche die zytotoxische Aktivität von bestimmten Chemotherapeutika fördert (Goto *et al.* 2003). So lässt sich auch über eine verminderte Sensitivität von Isoprenalin in eGFP-transduzierten Zellen spekulieren, dies war jedoch bisher nicht Gegenstand der Forschung. Darüber hinaus gibt es die berechnete Vermutung, dass eGFP-exprimierende Zellen sich stärker zusammenziehen, abrunden und vermehrt in die Apoptose gehen (Liu *et al.* 1998). Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass von der verstärkten eGFP-Expression eine gewisse Toxizität ausgeht und sich störend auf die Zellhomöostase auswirkt. Ein weiterer limitierender Faktor zu Evaluierung der I-1-Funktion ist, dass eine Isoprenalinstimulation zu einer vermehrten Expression des I-1 (Abb. 16) führt und somit der Vergleich zwischen nicht stimulierten und stimulierten Fibroblasten erschwert wird. Die gesteigerte Expression von I-1 lässt sich mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität des CMV-Promotors (Salem *et al.* 2006) erklären, welcher unter anderem Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor des  $\beta$ -adrenergen Effektors CREB besitzt (He und Weber 2004). Dies ließ sich auch anhand der Fluoreszenzaufnahmen bildlich untermauern (Abb. 15). Sie dokumentieren eine gesteigerte Fluoreszenz in den stimulierten Zellen, was sowohl für die eGFP-exprimierenden Kontrollzellen als auch die I-1-exprimierenden Kulturen zutrifft und somit im Einklang mit den proteinchemischen Analysen steht (Abb. 16).

Es ist davon auszugehen, dass in den Fibroblasten die gleichen Gesetzmäßigkeiten herrschen wie in Kardiomyozyten, was die Regulierung des I-1 angeht. Durch Aktivie-

rung der  $\beta$ -AR mittels Isoprenalin wird eine vermehrte Phosphorylierung des I-1 erreicht (Abb. 6). Die Phosphorylierung versetzt das Protein in den aktivierten Zustand und befähigt es so die PP-1 zu hemmen. In der Folge wird die Desphosphorylierung von Phospho-Substraten der PP-1 in der Zelle verlangsamt (El-Armouche *et al.* 2003). In Kardiomyozyten konnte dies anhand der gesteigerten Phosphorylierung des PKA-Zielproteins Phospholamban in Gegenwart einer gesteigerten Menge I-1 nachgewiesen werden (El-Armouche *et al.* 2006). Analog dazu wurde dieser Effekt hier durch Detektion von p-CREB auch in akut stimulierten I-1-exprimierenden Fibroblasten demonstriert (Abb. 17) und zeigt gleichzeitig, dass p-CREB ein Substrat des PP-1/I-1-Komplexes ist. In diesen Zellen war der Gehalt an p-CREB höher als in den akut stimulierten eGFP-exprimierenden Fibroblasten, was auf die Anwesenheit von I-1 zurückzuführen ist. Bereits in den unstimulierten I-1-exprimierenden Zellen ließ sich im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen ein erhöhtes p-CREB Signal feststellen (Abb. 17). Die vermehrte Phosphorylierung kam durch die verminderte Aktivität der PP-1 zustande. Durch Isoprenalinstimulation konnte anschließend synergistisch das Phosphorylierungsniveau weiter potenziert werden (Abb. 17). Dies geschieht durch die Aktivitätszunahme der PKA mit vermehrter Phosphorylierung von CREB aber auch von I-1 und somit einer Inhibierung der PP-1. Einschränkend sollte an dieser Stelle noch angemerkt werden, dass eine Normalisierung auf GAPDH und nicht auf CREB erfolgte, sodass theoretisch auch eine vermehrte Expression von CREB als Ursache für das gesteigerte Vorkommen von p-CREB in Betracht gezogen werden kann. Da es sich allerdings um eine akute Isoprenalinstimulation handelte, erscheint eine vermehrte Synthese von CREB innerhalb von 10 min eher unwahrscheinlich. Außerdem gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise für eine Isoprenalin-vermittelte Induktion der CREB-Synthese. Die Versuche zur chronischen Isoprenalinstimulation in I-1-exprimierenden Fibroblasten ergaben, dass der Effekt des I-1 scheinbar verloren geht, da kein Unterschied mehr im Phosphorylierungsniveau zwischen den I-1 und den eGFP-exprimierenden Fibroblasten festgestellt werden konnte. Möglicherweise kann der I-1 seine Wirkung nicht mehr entfalten, weil auch er als Teil des  $\beta$ -adrenergen Systems der Desensitivierung nach chronischer Stimulation unterliegt (Wittköpper 2011). In den chronisch stimulierten I-1-exprimierenden Zellen konnte kein signifikanter Anstieg von p-I-1 im Vergleich zu den unstimulierten I-1 Zellen bestimmt werden.

Das vermehrte Auftreten von p-I-1 war letztendlich nur eine Folge der vermehrten Expression von I-1 durch Aktivierung des CMV-Promotors innerhalb des viralen Genkonstrukts, nicht jedoch die Folge einer Anhebung des Phosphorylierungsniveaus in der Zelle. Der Quotient von p-I-1 zu Gesamt I-1 blieb nahezu konstant. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung ist die erwähnte Desensitivierung nach chronischer Stimulation. Der I-1 ist ein Bestandteil des  $\beta$ -adrenergen Systems und unterliegt ebenso einer Phosphorylierung durch die Proteinkinase A. Die Desensitivierung im Herzen ist bereits bekannt und in der Literatur beschrieben. So gehen erhöhte Katecholaminspiegel im Rahmen der Herzinsuffizienz mit einer Abnahme der Phosphorylierung des I-1 einher (El-Armouche und Eschenhagen 2009). Dieser Zusammenhang ließ sich nun auch hier isoliert in Fibroblasten veranschaulichen.

Im nächsten Schritt sollte erforscht werden, ob eine Modulation der profibrotischen Parameter durch die Überexpression des I-1 möglich ist. Theoretisch wäre eine stärkere Suppression zumindest von CTGF im Vorfeld zu erwarten, da in den vorangegangenen Versuchen ohne I-1-Überexpression die CTGF-Syntheserate durch Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Signalweges gesenkt werden konnte (Abb. 12) und der I-1 die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade zusätzlich verstärkt. Die Auswertung der Versuche lieferte allerdings keine Hinweise darauf, dass dies auch tatsächlich der Fall ist. Weder die Detektion von CTGF (Abb. 19) noch von  $\alpha$ -SMA (Abb.18) ließen einen klaren Einfluss des I-1 vermuten. Für beide Parameter konnte kein deutlich erkennbarer Unterschied zwischen den I-1- und den eGFP-exprimierenden Fibroblasten ermittelt werden. Der einzige entscheidende Faktor für die Herunterregulation von CTGF war die Isoprenalinstimulation und zwar unabhängig von der I-1-Präsenz. Die Regulation der  $\alpha$ -SMA-Expression scheint ohnehin komplexer und auch von Kulturbedingungen abhängig zu sein (Roy *et al.* 2003; Rohr 2011). Die Überexpression des I-1 als zusätzlicher Stimulus ist dem Anschein nach nicht suffizient genug um eine Suppression der beiden profibrotischen Parameter hervorzurufen. Die Inhibierung der PP-1 scheint unter den vorgegebenen Zellkulturbedingungen also keine ausreichende Wirkung zu entfalten, um letztendlich Einfluss auf die Expression des Markers zu nehmen. Als möglicher Erklärungsansatz für die Untersuchungsergebnisse kann auch hier die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung herangezogen werden. Nach chronischer Isoprenalinstimulation wiesen auch die I-1-exprimierenden Fibroblasten ein Rückgang von p-CREB auf

Basalniveau auf (Abb. 17). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das vermehrte Vorhandensein von p-I-1 die Desensitivierung nicht überwinden kann. Die Inhibierung der Expression profibrotischer Parameter wie CTGF und  $\alpha$ -SMA wiederum ist eng mit der Phosphorylierung von CREB verknüpft. Die TGF- $\beta_1$ -induzierte Smad-abhängige Gentranskription wird durch den Transkriptionsfaktor p-CREB blockiert (Schinner *et al.* 2015). Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade mit der Phosphorylierung von Phosphoproteinen wie CREB nur eine von mehreren fibrosehemmenden Teilkomponenten darstellt, welche erst durch cAMP aktiviert werden (Schinner *et al.* 2015). cAMP entfaltet seine antifibrotische Wirkung darüber hinaus auch durch die Aktivierung von Epac, welche PKA-unabhängig erfolgt. Es konnten noch weitere cAMP-vermittelte Prozesse entdeckt werden, die mit einer Fibrosehemmung in Verbindung gebracht werden (Schinner *et al.* 2015) Die Erhöhung der cAMP-Spiegel erweist sich im Umkehrschluss als wesentlich effektiver als eine bloße Verstärkung des  $\beta$ -adrenergen Signalweges auf Ebene des I-1. Eine Isoprenalingabe bewirkt eine solche cAMP-Erhöhung und ist deshalb der I-1-Überexpression hinsichtlich der Fibrosehemmung überlegen. Zusätzlich wird die I-1-vermittelte Modulation des Phosphorylierungsniveaus in der Zelle durch die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung nach chronischer Isoprenalingabe begrenzt.

Insgesamt muss man bei Betrachtung der Daten zusammenfassen, dass der I-1 in den Fibroblasten scheinbar keine herausragende Rolle im hier untersuchten Fibrose-Modell spielt. Bereits weiter oben im Text wurde geschlussfolgert, dass die  $\beta$ -adrenerge Aktivierung nur einen kleinen antifibrotischen Beitrag leistet. Sie kann die Restriktion einer überschießenden Fibrosierung begünstigen, jedoch nicht so sehr die Reparatur nach erfolgter Fibrose. Der I-1 vermag diesen Effekt weder zu steigern noch zu minimieren. *In vivo* stellt sich die Situation im Herzen ohnehin viel komplexer dar, zumal die Fibroblasten hier nicht isoliert agieren, sondern stets im Zusammenspiel mit den Kardiomyozyten.

Schlussendlich konnte in der Dissertation aufgezeigt werden, dass die rezeptorvermittelte Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Signalweges durch Isoprenalin fibrosefördernde Prozesse aufhalten kann. Dieses Prinzip wurde anhand der Suppression von CTGF nach chronischer Isoprenalinstimulation demonstriert. Bei genauerer Betrachtung liegt

der Schlüssel für diesen antifibrotischen Effekt in der Erhöhung von cAMP. Diese Zusammenhänge könnten neue Möglichkeiten für den Ausbau der antifibrotischen Therapie eröffnen. Es bieten sich dabei zwei Ansatzpunkte für potenzielle Pharmaka. Neben der Hemmung von CTGF durch spezifische Antikörper ohne Eingriff in die cAMP-Synthese könnten cAMP-steigernde Pharmaka für die Therapie der Fibrose in Erwägung gezogen werden (Duncan *et al.* 1999). Da die  $\beta$ -rezeptorvermittelte cAMP-Bereitstellung dem Prinzip der  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung unterliegt, erweist sie sich eher als begrenzt effektiv in der Fibrosebekämpfung. Andererseits könnte sich die Desensitivierung jedoch auch als vorteilhaft herausstellen, da sie insgesamt als adaptiver Schutzmechanismus eine harmonische Regulierung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs gewährleistet und eine überschießende Aktivierung verhindert. Inwieweit die  $\beta$ -adrenerge Aktivierung Anwendung in der Therapie der Fibrose findet, bleibt abzuwarten. Therapeutische Ansätze zur Steigerung der cAMP-Spiegel im Herzen existieren bereits. So werden PDE-Inhibitoren wie Milrinon kurzzeitig zur Verbesserung der Schlagkraft des Herzens im Rahmen der akuten Herzinsuffizienz eingesetzt. Ihre Anwendung zur Behandlung oder Verhinderung der Fibrose ist jedoch nicht umsetzbar, da eine dauerhafte cAMP-Steigerung im Rahmen der Herzinsuffizienz kontraproduktiv ist. Infolge des cAMP-Anstiegs kommt es neben der positiven Inotropie auch unverweigerlich zur positiven Chrono- und Lusitropie, was mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (Mika *et al.* 2012). Jedoch bietet die antifibrotische Wirkung von cAMP gegebenenfalls in anderen Organsystemen therapeutische Möglichkeiten. Das CTGF als therapeutisches Ziel ist deshalb so vielversprechend, weil es als nachgeschalteter Mediator von TGF- $\beta_1$  viele seiner profibrotischen Effekte bezüglich der Fibroblastenproliferation und Synthese der EZM initiiert (Grotendorst 1997), jedoch andere wichtige Eigenschaften von TGF- $\beta_1$  nicht kopiert. Eine Modulation von CTGF zur Behandlung der Fibrose wäre therapeutisch gesehen viel spezifischer als beispielsweise eine Ausschaltung von TGF- $\beta_1$ . Zudem entnehmen Duncan und Kollegen ihren Daten, dass die durch TGF- $\beta_1$ -angestoßene Kollagensynthese auch über CTGF-unabhängige Mechanismen ihren Weg nimmt, sodass durch cAMP-Erhöhung oder CTGF-Blockierung dieser Weg der Kollagensynthese unberührt bleibt und so ein gesundes Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Kollagens hergestellt werden kann (Duncan *et al.* 1999).

## 7. Literaturverzeichnis

Agarwal C, Britton ZT, Alaseirlis DA, Li Y, Wang JH (2006): Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, alpha-SMA expression, and contraction. *Ann Biomed Eng* 34(4), 653-9

Aitken A, Cohen P (1982): Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 147(1), 54-8

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

Aránguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M, Troncoso R, Vicencio JM, Carrillo C, Lara H, Lavandero S, Díaz-Araya G (2011): Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. *Biochim Biophys Acta* 1812(1), 23-31

Babic AM, Chen CC, Lau LF (1999): Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19(4), 2958-66

Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA (2007): Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3), H1883-91

Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK (2006): Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(3), H1015-26

Baum J, Duffy HS (2011): Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 57(4), 376-9

Beningo KA, Dembo M, Wang YL (2004): Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52), 18024-9

Benovic JL, Bouvier M, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988): Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* 4, 405-28

Bishop JE, Lindahl G (1999): Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res* 42(1), 27-44



## 7. Literaturverzeichnis

---

Bosman FT, Stamenkovic I (2003): Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200(4), 423-8

Bouvier M, Hnatowich M, Collins S, Kobilka BK, Deblasi A, Lefkowitz RJ, Caron MG (1988): Expression of a human cDNA encoding the beta 2-adrenergic receptor in Chinese hamster fibroblasts (CHW): functionality and regulation of the expressed receptors. *Mol Pharmacol* 33(2), 133-9

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, 248-54

Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991): Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114(6), 1285-94

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(3), 248-54

Bristow MR (2000): beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 8 101(5), 558-69

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, *et al.* (1986): Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59(3), 297-309

Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005): The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 657-87

Camelliti P, Borg TK, Kohl P (2005): Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65(1), 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(7), 1947-58

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(2), 176-85

## 7. Literaturverzeichnis

---

Chen Y, Segarini P, Raoufi F, Bradham D, Leask A (2001): Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome. *Exp Cell Res* 15 271(1), 109-17

Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA (1997): Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272(27), 17223-9

Chow BS, Chew EG, Zhao C, Bathgate RA, Hewitson TD, Samuel CS (2012): Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS. *PLoS One* 7(8), e42714

Cohen PT (1988): Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett* 232(1), 17-23

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(3), 569-82

Connor JH, Frederick D, Huang Hb, Yang J, Helps NR, Cohen PT, Nairn AC, DePaoli-Roach A, Tatchell K, Shenolikar S (2000): Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem* 275(25), 18670-5

Corda S, Samuel JL, Rappaport L (2000): Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 5(2), 119-30

Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE (1997): The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18(2), 208-25

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(3), 321-38

Darby I, Skalli O, Gabbiani G (1990): Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63(1), 21-9

## 7. Literaturverzeichnis

---

Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG (1994): Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem* 223(2), 351-7

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005): Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13(1), 7-12

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(3), 577-83

Doughty RN, Rodgers A, Sharpe N, MacMahon S (1997): Effects of beta-blocker therapy on mortality in patients with heart failure. A systematic overview of randomized controlled trials. *Eur Heart J* 18(4):560-5

D'Souza KM, Malhotra R, Philip JL, Staron ML, Theccanat T, Jeevanandam V, Akhter SA (2011): G protein-coupled receptor kinase-2 is a novel regulator of collagen synthesis in adult human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 286(17), 15507-16

Duncan MR1, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR (1999): Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13(13), 1774-86

Eghbali M (1992): Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 2, 183-9

El-Armouche A, Eschenhagen T (2009): Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14(4), 225-41

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003): Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17(3), 437-9

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(1), 87-93

## 7. Literaturverzeichnis

---

- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié 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* 4 346(3), 700-6
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007): Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9(11), 1077-80
- El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T (2008): Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 80(3):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(23), 13415-8
- Engelhardt S, Böhm 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(1), 146-54
- Entcheva E, Bien H (2009): Mechanical and spatial determinants of cytoskeletal geodesic dome formation in cardiac fibroblasts. *Integr Biol (Camb)* 1(2), 212-9
- Eschenhagen T (2008): Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14(5), 485-7
- Eto M, Kitazawa T, Brautigan DL (2004): Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24), 8888-93
- Fan YH, Dong H, Pan Q, Cao YJ, Li H, Wang HC (2011): Notch signaling may negatively regulate neonatal rat cardiac fibroblast-myofibroblast transformation. *Physiol Res* 60(5), 739-48
- Feng XH, Derynck R (2005): Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-93
- Flather MD, Yusuf S, Køber L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moyé L, Braunwald E (2000): Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular

## 7. Literaturverzeichnis

---

dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 355(9215), 1575-81

Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996): Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107(3), 404-11

Gancedo JM (2013). Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88(3), 645-68

Gerzanich V, Ivanova S, Simard JM (2003): Early pathophysiological changes in cerebral vessels predisposing to stroke. *Clin Hemorheol Microcirc* 29(3-4), 291-4

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S (2013): Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127(1), e6-e245

Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B (2006): Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 172(2), 259-68

Goto H, Yang B, Petersen D, Pepper KA, Alfaro PA, Kohn DB, Reynolds CP (2003): Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2(9), 911-7

Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS (1998): Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 40(2), 352-63

Grotendorst GR (1997): Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3), 171-9

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR (2004): Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 18(3), 469-79

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* 270(4 Pt 2), H1159-64

## 7. Literaturverzeichnis

---

Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003): Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(6), H2373-81

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(6), 1470-8

Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM (2011): Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Eng Part A* 17(5-6), 713-24

Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273(2), 669-72

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 4(11), 2881-9

He, B. and G. F. Weber (2004): Synergistic activation of the CMV promoter by NF-kappaB P50 and PKG. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 13-20

Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001): Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12(9), 2730-41

Huang FL, Glinsmann WH (1978): Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70(2), 419-26

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(4), 482-9

Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, Srivastava D (2010): Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell* 16(2), 233-44

Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K (1995): Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105(2), 280-4

Ignatz RA, Massagué J (1986): Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261(9), 4337-45

## 7. Literaturverzeichnis

---

Ihn H (2002): Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14(6), 681-5

Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, Snead A, Lu D, Aroonsakool N (2012): cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol* 166(2), 447-56

Isenberg G, Kazanski V, Kondratev D, Gallitelli MF, Kiseleva I, Kamkin A (2003): Differential effects of stretch and compression on membrane currents and  $[Na^+]_i$  in ventricular myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 82(1-3), 43-56

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), 1-6

Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC (1999): Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem* 274(34), 24321-7

Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Günther J, Theres H, Scholz H (2003): Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol* 82(1-3), 111-20

Kannel WB, Ho K, Thom T (1994): Changing epidemiological features of cardiac failure. *Br Heart J* 72(2 Suppl), S3-9

Kapur NK, Wilson S, Yunis AA, Qiao X, Mackey E, Paruchuri V, Baker C, Aronovitz MJ, Karumanchi SA, Letarte M, Kass DA, Mendelsohn ME, Karas RH (2012): Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation* 125(22), 2728-38

Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B (2001): Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J Biol Chem* 276(39), 36575-85

Kindermann M (2007): How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 28(21), 2686

Kitzman DW, Higginbotham MB, Cobb FR, Sheikh KH, Sullivan MJ (1991): Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: failure of the Frank-Starling mechanism. *J Am Coll Cardiol* 17(5), 1065-72

## 7. Literaturverzeichnis

---

- 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(3), 907-14
- Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB (2003): Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(5):537-44
- Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR (1998): Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 12(12), 1151-61
- Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R (2010): The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 225(3), 631-7
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-5
- Lamyel F, Warnken-Uhlich M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Ahmedat AS, Smit M, Gosens R, Meurs H, Miller-Larsson A, Racké K (2011): The  $\beta$ 2-subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384(2), 133-45
- Lau YH, Robinson RB, Rosen MR, Bilezikian JP (1980): Subclassification of beta-adrenergic receptors in cultured rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res* 47(1), 41-8
- Laviades C, Varo N, Díez J (2000): Transforming growth factor beta in hypertensives with cardiorenal damage. *Hypertension* 36(4), 517-22
- Leask A (2007): TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74(2), 207-12
- Leask A, Abraham DJ (2003): The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* 81(6), 355-63
- Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ (2003): Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 278(15), 13008-15



## 7. Literaturverzeichnis

---

Leicht M, Greipel N, Zimmer H (2000): Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture. *Cardiovasc Res* 48(2), 274-84

Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP (2009): Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS One* 4(10), e7307

Li R, Shen Y (2013): An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci* 92(13), 747-51

Lijnen P, Petrov V (2002): Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24(6), 333-44

Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ (1998): Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 260(3), 712-7

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(6), 1992-2003

Liu X, Li F, Sun SQ, Thangavel M, Kaminsky J, Balazs L, Ostrom RS (2010): Fibroblast-specific expression of AC6 enhances beta-adrenergic and prostacyclin signaling and blunts bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298(6), L819-29

Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003): What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93(10), 896-906

López B, González A, Díez J. (2004): Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(2), 197-204

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(6), 787-93

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(2), 218-26

## 7. Literaturverzeichnis

---

- MacLennan DH, Kranias EG (2003): Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7), 566-77
- Marienfeld U, Walter U, Simm A (2001): Inhibition of rat cardiac fibroblast growth by cAMP-but not by cGMP-dependent protein kinase. *Basic Res Cardiol* 96(2), 184-91
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S (1996): Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9) :4219-23
- McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ (1998): Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 98(24), 2765-73
- McMurray JJ, Stewart S (2000): Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83(5), 596-602
- Mehel H, Emons J, Vettel C, Wittköpper K, Seppelt D,, Lutz S, Sossalla S, Eschenhagen T, Zimmermann WH, El-Armouche A (2013): Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts  $\beta$ -adrenergic responses in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 62(17), 1596-606
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012): PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 52(2), 323-9
- 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(1), 153-9
- Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Vallé CA, Roy M (2004): Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *J Cell Physiol* 198(3), 350-8
- 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. *Circ Res* 69(6), 1450-7
- Nimmo GA, Cohen P (1978): The regulation of glycogen metabolism. Phosphorylation of inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle, and its interaction with protein phosphatases-III and -II. *Eur J Biochem* 87(2), 353-65

## 7. Literaturverzeichnis

---

O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, Adams KF Jr, McNulty SE, Grossman SH, McKenna WJ, Zannad F, Swedberg K, Gheorghiade M, Califf RM (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(1 Pt 1), 78-86

Ottaviano FG, Yee KO (2011) Communication signals between cardiac fibroblasts and cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(5), 513-21

Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1991): Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 266(21), 14064-71

Ozgen N, Obreztkhikova M, Guo J, Elouardighi H, Dorn GW 2nd, Wilson BA, Steinberg SF (2008): Protein kinase D links Gq-coupled receptors to cAMP response element-binding protein (CREB)-Ser133 phosphorylation in the heart. *J Biol Chem* 283(25), 17009-19

Petroll WM, Cavanagh HD, Barry P, Andrews P, Jester JV (1993): Quantitative analysis of stress fiber orientation during corneal wound contraction. *J Cell Sci* 104 ( Pt 2), 353-63

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ (2002) Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 39(2), 258-63

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999): Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1), C1-9

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(50), 38599-608

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(1), H762-9

Rohr S (2011): Cardiac fibroblasts in cell culture systems: myofibroblasts all along? *J Cardiovasc Pharmacol* 57(4), 389-99

## 7. Literaturverzeichnis

---

Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A (2008): Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells* 26(11), 2884-92

Roy S, Khanna S, Bickerstaff AA, Subramanian SV, Atalay M, Bierl M, Pendyala S, Levy D, Sharma N, Venojarvi M, *et al.* (2003): Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res* 92(3), 264-71

Sachse FB, Torres NS, Savio-Galimberti E, Aiba T, Kass DA, Tomaselli GF, Bridge JH (2012): Subcellular structures and function of myocytes impaired during heart failure are restored by cardiac resynchronization therapy. *Circ Res* 110(4), 588-97

Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molkentin JD, Nairn AC, Bibb JA (2006): Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem* 281(34), 24322-35

Salem HK, Ranjzad P, Driessen A, Appleby CE, Heagerty AM, Kingston PA (2006): Beta-adrenoceptor blockade markedly attenuates transgene expression from cytomegalovirus promoters within the cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(10), 2267-74

Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B, Crystal RG (1982): Modulation of collagen production by fibroblasts. Effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem J* 204(1), 25-30

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(6), 1573-84

Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G (1990): Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 63(2), 144-61

Schinner E, Wetzl V, Schlossmann J (2015): Cyclic nucleotide signalling in kidney fibrosis. *nt J Mol Sci* 16(2), 2320–2351

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-61

## 7. Literaturverzeichnis

---

Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, Fonseca C, du Bois RM, Martin GR, Black CM, Abraham DJ (2000): *Exp Cell Res* 259(1), 213-24

Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987): Molecular mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization. *Adv Exp Med Biol* 221, 253-73

Skeberdis VA (2004): Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)* 40(5), 407-13

Souders CA, Bowers SL, Baudino TA (2009): Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105(12), 1164-76

Sovari AA, Karagueuzian HS (2011): Myocardial fibrosis as a risk stratifier for sudden arrhythmic death. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 9(8), 951-3

Srivastava, D. (2009): Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev. Cell* 16, 233–244

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2013

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S (2000): Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 135(4), 316-23

Suzuki T, Nguyen CT, Nantel F, Bonin H, Valiquette M, Frielle T, Bouvier M (1992): Distinct regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in Chinese hamster fibroblasts. *Mol Pharmacol* 41(3), 542-8.

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(2), 437-42

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26(11), 1115-40

Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I (2003): Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med* 42(6), 465-9

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Thomas JA, Marks BH (1978): Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 41(2), 233-43
- Torphy TJ, Zhou HL, Cieslinski LB (1992): Stimulation of beta adrenoceptors in a human monocyte cell line (U937) up-regulates cyclic AMP-specific phosphodiesterase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 263(3), 1195-205
- Trautwein W, Hescheler J (1990): Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol* 52, 257-74
- Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr (2003): Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 9(1), 53-61
- Turner NA, Porter KE, Smith WH, White HL, Ball SG, Balmforth AJ (2003): Chronic beta2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism. *Cardiovasc Res* 57(3), 784-92
- Unger T, Li J (2004): The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, S7-10
- Van Harmelen V, Lönnqvist F, Thörne A, Wennlund A, Large V, Reynisdottir S, Arner P (1997): Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21(11), 972-9
- Vettel C, Lämmle S, Ewens S, Cevirgen C, Emons J, Ongherth A, Dewenter M, Lindner D, Westermann D, Nikolaev VO, Lutz S, Zimmermann WH, El-Armouche A (2014): PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306(8), H1246-52
- Vozenin MC, Lefaix JL, Ridi R, Biard DS, Daburon F, Martin M (1998): The myofibroblast markers  $\alpha$ -SM actin and  $\beta$ -actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of fibrotic and normal skin. *Cytotechnology*. 26(1), 29-38
- Wachter SB, Gilbert EM (2012): Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology* 122(2), 104-12
- Wallukat G(2002): The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27(7), 683-90

## 7. Literaturverzeichnis

---

Welch MP, Odland GF, Clark RA (1990): Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 110(1), 133-45

Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B (2007): Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 179(6), 1311-23

Wittköpper K, Eschenhagen T, El-Armouche A (2010): Phosphatase-1-inhibitor-1: amplifier or attenuator of catecholaminergic stress? *Basic Res Cardiol* 105(5), 569-71

Wittköpper K, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A (2011): Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological  $\beta$ -adrenoceptor signalling. *Cardiovasc Res* 91(3), 392-401

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR (1988): Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB *Nature* 334(6182), 494-8

Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, and Insel P (2008): The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6386-6391

Yuan W, Varga J (2001): Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* 276(42), 38502-10

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

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Personen zu bedanken, die eine Fertigstellung dieser Dissertation möglich gemacht haben. Mein ganz spezieller Dank gilt dabei Prof. Dr. med. Ali El-Armouche für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas. Hervorzuheben ist die exzellente Betreuung über den gesamten Zeitraum. Durch seine positive Einstellung und seinen Enthusiasmus konnte er mich von Beginn an für die Forschung und seine Ideen begeistern.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei dem Leiter des Institutes der Pharmakologie an der UMG, Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, für die Möglichkeit meine Disseration an seinem Institut durchzuführen sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.

Ein ganz spezieller Dank gebührt auch Dr. Christiane Vettel, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr verdanke ich das fachliche Verständnis und das Hintergrundwissen rund um meine Arbeit. Durch ihre Unterstützung konnte ich viel über das gründliche und präzise Arbeiten im naturwissenschaftlichen Bereich lernen.

Vielen Dank auch an Dr. Simon Lämmle für die Hilfestellung und die Bereitstellung des Ad-GFP. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. Katrin Wittköpper für die Bereitstellung des Ad-I-1 und seiner Mutanten bedanken. Bedanken muss ich mich auch bei Sebastian Ewens für die hervorragende Einarbeitung und die Hilfsbereitschaft. Aber auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt meine Dankbarkeit für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Dazu gehören: Danilo Seppelt, Julius Emmons, Kristian Otte, Matthias Dewenter. Auch das gemeinsame Arbeiten mit den Kollegen der anderen Arbeitsgruppen hat mir sehr viel Freude bereitet.

Auch ohne die tolle Arbeit der vielen technischen Assistenten, die stets für einen reibungslosen Ablauf im Labor gesorgt haben, wäre meine Dissertation nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich uneingeschränkt in allen Lebenslagen unterstützt haben. Danke auch an Anastasia Tsilke.



## Lebenslauf

Mein Name ist Ceyhun Cevirgen, ich bin ledig und wurde am 23.01.1987 in Bad Oeynhausen geboren. Meine Staatsangehörigkeit ist deutsch. Zur Zeit bin ich wohnhaft in Löhne.

Meine schulische Laufbahn begann im August 1993 an der Grundschule Löhne-Gohfeld. Anschließend besuchte ich vom August 1997 bis zum Mai 2006 das Städtische Gymnasium Löhne und schloss dort mein Abitur mit der Endnote 1,2 ab. Es folgte ein Hochschulstudium vom Oktober 2006 bis zum November 2013 an der Universität Göttingen im Fach Humanmedizin, welches ich mit dem zweiten Staatsexamen und der Note „gut“ erfolgreich absolvierte.

Mein Forschungsaufenthalt am Institut der Pharmakologie und Toxikologie der Universität Göttingen erstreckte sich vom April 2011 bis zum Oktober 2012. Im Rahmen meiner Dissertation war ich an der Publikation „PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways“ von der Arbeitsgruppe um Christiane Vettel und Simmon Lämmle beteiligt.

Nach Beendigung meines Studiums begann ich zunächst eine ärztliche Tätigkeit im Bereich der Kardiologie und Intensivmedizin im Klinikum Bielefeld Mitte vom Oktober 2014 bis zum Mai 2016. Anschließend folgte nach einer halbjährigen Anstellung in der Unfallchirurgie im Friederikenstift Hannover ein Wechsel in die Kardiologie im Augusta Krankenhaus Düsseldorf.