

UNIVERSITÄTSKLINIKUM DES SAARLANDES  
KLINIK FÜR INNERE MEDIZIN III  
KARDIOLOGIE, ANGIOLOGIE UND INTERNISTISCHE INTENSIVMEDIZIN  
DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. MED. M. BÖHM

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines**

***Doktors der Medizin***

**der Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes**

---

Mechanismen der Desensibilisierung  
kardialer  $\beta$ -Adrenozeptoren und ihrer  
Resensibilisierung durch  $\beta$ -Blocker

eingereicht durch

**Illkyu-Oliver Lee**

Homburg/Saar im Januar 2013

**Meinen geliebten Eltern**

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Summary.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1. Herzinsuffizienz und Epidemiologie .....	7
2.1.1. Definition und Einteilung.....	7
2.1.2. Epidemiologie.....	8
2.2. Ursachen und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz .....	9
2.2.1. Die Ursachen.....	9
2.2.2. Neuroendokrine Aktivierung .....	9
2.2.3. Das $\beta$ -Adrenerge System .....	9
2.2.4. $\beta$ -Blocker als therapeutisches Prinzip bei Patienten mit Herzinsuffizienz	11
2.2.5. Unterschiede zwischen Metoprolol und Carvedilol .....	13
2.2.6. Phosphodiesterasen.....	15
2.2.7. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase).....	16
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1. Materialien .....	19
3.1.1. Materialien für die Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln .....	19
3.1.2. Material für die Western-Blot Analyse .....	19
3.1.3. Material für die Bestimmung des $\beta$ -AR Polymorphismus.....	19
3.1.4. Substanzen zur Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln (Tyrode Lösung) .....	20
3.1.5. Substanzen für die Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln .....	20
3.1.6. Substanzen und Materialien zur Durchführung der Gelelektrophorese und des Western-Blots .....	21
3.2. Methoden.....	22
3.2.1. Präparation rechtsatrialer Trabekel .....	22
3.2.2. Versuchsdurchführung .....	22
3.2.3. Sequenzielle $\alpha$ - und $\beta$ -Blockade.....	23
3.2.4. Durchführung der Westen-Blot Experimente .....	24
3.2.4.1. Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese.....	24
3.2.4.2. Western Blot von SDS-Gelen.....	25
3.2.4.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	25
3.3. Statistische Analyse .....	26
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>
4.1. Vorarbeiten .....	27
4.1.1. Unterschiedliche Sensibilität kardialer $\beta$ -AR für Isoprenalin .....	27
4.1.2. Carvedilol weist eine langsamere Assoziation mit $\beta$ -AR auf und resensibilisiert Trabekel aus desensibilisiertem Vorhofmyokard .....	28
4.2. Kardiale Kontraktilität nach selektiver Stimulation von $\beta_1$ -AR und $\beta_2$ -AR .....	29

4.2.1. Biphasisches Ansprechen auf $\beta_1$ -AR Stimulation ist mit Rezeptor Desensibilisierung assoziiert .....	30
4.2.2. Auswertung der Patienten-Charakteristika .....	33
4.2.3. Effekte der $\beta_2$ -AR Stimulation .....	35
4.3. Abnahme der Kraft nach Erreichen des Maximums ist auf Phosphodiesterasen zurückzuführen .....	38
4.4. Die Rolle der PI3-Kinase .....	42
4.5. Sind PI3K und PDE4 Teile desselben Signaltrans- duktionsweges? .....	45
4.6. Der Einfluss von Carvedilol und Metoprolol auf die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft sowie die Sensibilität kardialer $\beta$ -AR .....	47
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>50</b>
5.1. $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion .....	50
5.2. Effekte von Carvedilol und Metoprolol auf den PI3-Kinase und PDE4- abhängigen Signalweg .....	59
5.2.1. Inhibiert Carvedilol die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Gs und somit die PI3K- Aktivierung? .....	60
5.2.2. Inhibiert Carvedilol die $\beta$ ARK-assoziierte PI3-Kinase Aktivität? .....	61
5.2.3. Inhibiert Carvedilol direkt die PDE4? .....	63
5.2.4. Carvedilol erleichtert die Dissoziation der PDE4 vom $\beta_1$ -AR .....	63
5.2.5. Carvedilol potenziert den $\beta$ -AR Agonisten-induzierten Anstieg des subsarkolemmalen cAMP .....	64
5.2.6. Sind die Ergebnisse auch auf linksventrikuläres Myokard übertragbar? .	65
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Publikationen/Danksagung .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>76</b>

# 1. Zusammenfassung

Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer sympathischen Aktivierung, die eine Desensibilisierung und Herabregulation kardialer  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta$ -AR) bedingt. Die Therapie von Patienten mit Herzinsuffizienz mit  $\beta$ -AR Antagonisten ( $\beta$ -Blockern) verbessert deren linksventrikuläre (LV) Funktion und Prognose. Der  $\beta$ -Blocker Metoprolol, jedoch nicht Carvedilol, führt zu einer Heraufregulation kardialer  $\beta$ -AR. Dennoch steigert der  $\beta$ -AR Agonist Dobutamin das Herzzeitvolumen bei Metoprolol- und Carvedilol-behandelten Patienten im gleichen Ausmaß. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Mechanismus, wie Carvedilol eine Resensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR unabhängig von einer Beeinflussung der Rezeptordichte herbeiführt. Die Studien wurden an isolierten rechtsatrialen Trabekeln von Patienten durchgeführt, die einer Herzoperation unterzogen wurden. Die Trabekel wurden bei 37°C und 1 Hz elektrisch stimuliert und die isometrische Kontraktionskraft gemessen. Die Zugabe kumulativer Konzentrationen des  $\beta$ -AR Agonisten Noradrenalin (NA) in der Gegenwart des  $\beta_2$ -AR selektiven Antagonisten ICI 118.551 stellte eine  $\beta_1$ -AR selektive Stimulation dar und induzierte mit steigender Konzentration positiv inotrope Effekte, die jedoch in 33 von 66 Trabekeln durch eine sekundäre Abnahme dieses positiv inotropen Effektes innerhalb von etwa 15 min gefolgt waren, während in der anderen Hälfte der Experimente der positiv inotrope Effekt dauerhaft anhielt. Die sekundäre Abnahme der Kontraktilität war mit einer Desensibilisierung der  $\beta_1$ -AR assoziiert, was sich in einer Rechtsverschiebung der NA EC<sub>50</sub> Werte bestätigte. Durch Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) oder der Phosphodiesterase 4 (PDE4) konnte die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft verhindert und die Sensibilität der  $\beta_1$ -AR für NA wieder hergestellt werden. Die kombinierte Inhibition der PI3K und PDE4 hatte keinen additiven Effekt, was suggeriert, dass PI3K und PDE4 Teil desselben Signaltransduktionsweges sind, die eine Desensibilisierung des  $\beta_1$ -AR bedingen. Eine Vorinkubation der Trabekel mit Metoprolol blockierte zwar den positiv inotropen Effekt, ohne jedoch einen Einfluss auf die sekundäre Abnahme der Kraft zu haben. Im Gegensatz dazu führte eine kurzzeitige Inkubation der Trabekel mit Carvedilol (für 3-5 min) zu keiner Blockade des initial positiv inotropen Effektes, verhinderte aber die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft, ähnlich den Effekten einer PDE4- oder PI3K-Inhibition. Vergleichbare Effekte von Carvedilol wurden auch durch selektive Stimulation von  $\beta_2$ -

AR durch Adrenalin in der Gegenwart des  $\beta_1$ -AR selektiven Antagonisten CGP 207.12A beobachtet. Es lässt sich schlussfolgern, dass Carvedilol kardiale  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR durch Inhibition eines PI3K- und PDE4-abhängigen Signalwegs resensibilisiert. Dies könnte den vergleichbaren Dobutamin-induzierten Anstieg des Herzzeitvolumens bei Carvedilol- und Metoprolol-behandelten Patienten mit Herzinsuffizienz trotz unterschiedlicher Beeinflussung der  $\beta$ -AR Dichte durch die beiden Substanzen erklären und den günstigen Effekten von Carvedilol auf die LV Funktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz zugrunde liegen.

## 1. Summary

### **Mechanisms of cardiac $\beta$ -adrenergic receptor desensitization and their resensitization by $\beta$ -blockers**

In patients with chronic heart failure, the activation of the sympathetic nervous system desensitizes and downregulates cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR). Treatment of patients with heart failure with  $\beta$ -AR antagonists ( $\beta$ -blockers) improves left ventricular (LV) function and prognosis. The  $\beta$ -blocker metoprolol, but not carvedilol upregulates cardiac  $\beta$ -ARs in heart failure patients. Nevertheless, the  $\beta_1$ -AR agonist dobutamine increases cardiac output to the same extent in metoprolol and carvedilol treated patients. The present thesis examined the mechanisms by which carvedilol resensitizes cardiac  $\beta$ -ARs despite a lack of upregulation of  $\beta$ -AR density. Experiments were performed on human right atrial trabeculae of patients undergoing cardiac surgery. Trabeculae were mounted in organ baths at 37°C, were electrically stimulated at 1 Hz, and the resultant isometric force was recorded. The application of cumulative concentrations of noradrenaline (NA) in the presence of the selective  $\beta_2$ -AR blocker ICI 118.551 induced selective  $\beta_1$ -AR stimulation and led to positive inotropic effects after every cumulative concentration. In 33 of 66 trabeculae, the initial positive inotropic effect was followed by a secondary decay of force within ~15 min, while in the other half of the experiments, force remained stable. The secondary decay of force was associated with desensitization of  $\beta_1$ -ARs, indexed by a rightward shift in the NA EC<sub>50</sub> values. By inhibiting either phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) or phosphodiesterase 4 (PDE4), the secondary decay of force was

completely prevented and the  $\beta_1$ -AR sensitivity to NA was restored to control levels. The combined inhibition of PI3K and PDE4 had no additive effect, suggesting that cardiac  $\beta_1$ -ARs are desensitized by a signalling pathway that involves the sequential activation of both PI3K and PDE4. Preincubation of trabeculae with metoprolol inhibited the positive inotropic effect of NA, but did not prevent the secondary decay of force. In contrast, short-term preincubation with carvedilol (for 3-5 min) did not prevent the initial positive inotropic effect, but completely prevented the secondary decay of force, comparable to the effects of PI3K- or PDE4-inhibition. Similar effects were observed after selective  $\beta_2$ -AR stimulation induced by adrenaline combined with the  $\beta_1$ -AR selective antagonist CGP 207.12A. We conclude that carvedilol resensitizes cardiac  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs by inhibiting a PI3K- and PDE4-dependent signalling pathway. This could explain the similar dobutamine-induced increases in cardiac output in carvedilol and metoprolol treated patients despite a lack of upregulation of myocardial  $\beta_1$ -AR density. This mechanism may underlie the beneficial effect of carvedilol on LV function in patients with heart failure.

## 2. Einleitung

### 2.1. Herzinsuffizienz und Epidemiologie

#### 2.1.1. Definition und Einteilung

Die WHO definiert die Herzinsuffizienz als die Unfähigkeit des Herzens, den Körper ausreichend mit Blut und somit für den Stoffwechsel notwendigem Sauerstoff zu versorgen. Die Ursache hierfür ist eine kontraktile Dysfunktion des Herzens, die sich klinisch durch den Symptomenkomplex Kurzatmigkeit, schnelle Ermüdbarkeit und Flüssigkeitsretention äußert.

Man unterscheidet die *akute* und *chronische* Form der Herzinsuffizienz.

Die *akute* Herzinsuffizienz kann sich aus einer dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz heraus entwickeln oder entsteht in Folge eines Herzinfarkts, einer hypertensiven Krise (McMurray and Stewart, 2000) oder im Rahmen tachykarder Herzrhythmusstörungen. Die häufigste Ursache der *chronischen* Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit, allein oder in Kombination mit einer arteriellen Hypertonie.

Des Weiteren kann die chronische Herzinsuffizienz in eine *systolische* und eine *diastolische* Herzinsuffizienz eingeteilt werden. Die Inzidenz einer systolischen Herzinsuffizienz (HFrEF = heart failure with *reduced* ejection fraction), ist vergleichbar mit der Inzidenz einer diastolischen Herzinsuffizienz, auch HFpEF genannt (heart failure with *preserved* ejection fraction) (Owan et al., 2006). Von HFpEF sind mehr Frauen, ältere Patienten, Diabetiker und Hypertoniker betroffen. Der HFrEF liegt in den meisten Fällen eine ischämische Genese zugrunde.

Das klinische Stadium beider Formen wird anhand des Leitsymptoms Dyspnoe entsprechend der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) abgeschätzt. Die Einteilung erfolgt in die Stadien I-IV (Tabelle 1):

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz nach NYHA (New York Heart Association)

*NYHA I* Keine körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina Pectoris.

*NYHA II* Leichte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris bei alltäglicher körperlicher Belastung.

*NYHA III* Höhergradige Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris bei geringer körperlicher Belastung.

*NYHA IV* Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

Weitere mögliche Symptome sind Nykturie, Müdigkeit und Leistungsminderung. Außerdem sind in der klinischen Untersuchung typischerweise Ödeme abhängiger Körperpartien, Tachykardie, Hepatomegalie, hepatojugulärer Reflux, Aszites, Jugularvenenstauung, pulmonale Rasselgeräusche, Kardiomegalie und ein 3. Herzton zu beobachten (Borlaug and Paulus, 2011).

### **2.1.2. Epidemiologie**

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz nimmt mit steigendem Alter zu. Die Prävalenz in der Patientengruppe  $\leq 65$  Jahre liegt zwischen 0,4% bis 2%, bei Patienten  $\geq 65$  Jahre steigt sie bis auf 8% an. Zusätzlich konnte eine Zunahme der Prävalenz in den letzten Jahrzehnten verzeichnet werden, was auf das sich erhöhende Durchschnittsalter der Gesellschaft zurückzuführen ist. Die Langzeitprognose der Herzinsuffizienz ist ungünstig und mit der von Malignomen vergleichbar (McMurray and Stewart, 2000). Die mittlere Überlebenszeit beträgt für Männer 1,7 und für Frauen 3,2 Jahre bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 25% für Männer und 38% für Frauen. Die Prognose ist abhängig vom Schweregrad der Erkrankung. Patienten mit einer leichten Herzinsuffizienz (NYHA Stadium I-II) haben eine 2-Jahres-Überlebensrate von 80-90%, in einem fortgeschrittenem Stadium (NYHA III-IV) nur noch von 25%. Weiterhin ist die Prognose sowohl bei Frauen als auch Männern altersabhängig. Je älter Patienten bei Diagnosestellung sind, desto ungünstiger ist ihre Prognose (Ho et al., 1993).

## **2.2. Ursachen und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz**

### **2.2.1. Die Ursachen**

Die Ursachen einer Herzinsuffizienz sind vielfältig. So haben beispielsweise die Framingham-Studie (Ho et al., 1993) und auch andere Untersuchungen (Eriksson et al., 1989; Remes et al., 1992) gezeigt, dass mehr als drei Viertel der Fälle einer Herzinsuffizienz auf einer arteriellen Hypertonie und koronarer Herzkrankheit beruhen. Risikofaktoren sind eine verminderte Glukosetoleranz, erhöhte Plasma-Cholesterin-Spiegel, Übergewicht, Rauchen und eine erhöhte basale Herzfrequenz (Kannel and Cupples, 1988).

### **2.2.2. Neuroendokrine Aktivierung**

Schon in der Frühphase der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Aktivierung neuroendokriner Mechanismen, die bei akutem Kreislaufversagen (d.h. in einem Schockgeschehen) sinnvoll sein können, um den Blutdruck aufrechtzuerhalten und eine ausreichende Durchblutung der lebenswichtigen Organe und die damit verbundene Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Doch haben diese Kompensationsmechanismen, zu denen u. a. eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems (SNS) zählen, im Rahmen einer chronischen Aktivierung einen ungünstigen Einfluß auf die kardiale Funktion (Abbildung 1).

### **2.2.3. Das $\beta$ -Adrenerge System**

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz werden erhöhte Plasma-Noradrenalin Spiegel gemessen. Die Höhe der Noradrenalin Spiegel korreliert dabei umgekehrt proportional mit der Prognose der Patienten (Cohn et al., 1984). Tatsächlich ist die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation kausal mit dem Entstehen einer Herzinsuffizienz verknüpft. Eine etwa 15-fache kardiomyozytäre Überexpression des humanen  $\beta_1$ -Adrenozeptors (AR) führte in einem transgenen Mausmodell zunächst zu kardialer Hypertrophie und im Verlauf zu einer linksventrikulären (LV) Dilatation und kontraktile Dysfunktion sowie vermehrter interstitieller Fibrose (Engelhardt et al., 1999). Diese Umbauprozesse des Myokards

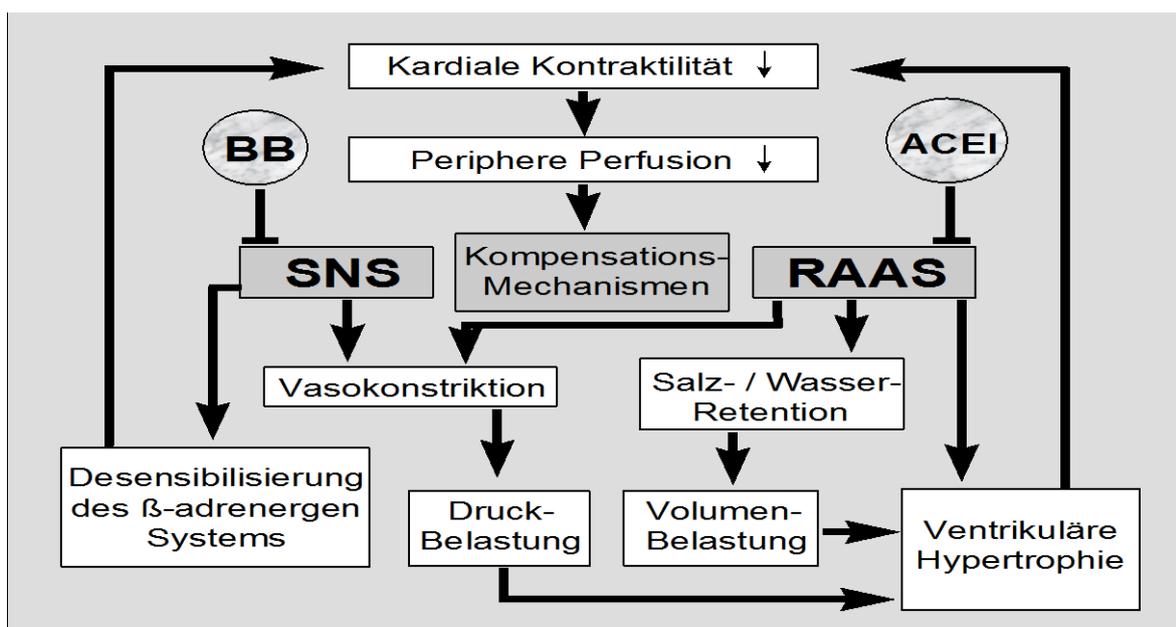
bezeichnet man als „kardiales Remodeling“. Auf myozytärer Ebene liegen diesem Remodeling eine kardiomyozytäre Hypertrophie, Apoptose und Nekrose zugrunde.

Die Aktivierung kardialer  $\beta$ -AR führt zur Stimulation der Adenylatzyklase über die Aktivierung des stimulatorischen G-Proteins ( $G_s$ ). An der Adenylatzyklase wird vermehrt zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) gebildet, welches als intrazellulärer Botenstoff eine Reihe von zellulären Funktionen reguliert. Im Herzen führt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die wiederum diverse Proteine phosphoryliert, die insbesondere für die elektromechanische Kopplung verantwortlich sind. Dazu zählen der sarkolemmale L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanal, der Ryanodin-Rezeptor, Troponin I und Phospholamban, welches die sarkoplasmatische Retikulum (SR)  $Ca^{2+}$  ATPase inhibiert (Bers, 2002). Somit führt die Stimulation kardialer  $\beta$ -AR über eine Steigerung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms über L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle sowie eine erhöhte  $Ca^{2+}$  Beladung des SR zu erhöhten Amplituden und beschleunigten Anstiegs- und Abnahmegeschwindigkeiten der  $Ca^{2+}$  Transienten, was sich in positiv inotropen und lusitropen Effekten am Herzmuskel äußert. Die räumliche und zeitliche Limitierung des cAMP Signals erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDE). In der vorliegenden Arbeit soll u. a. geklärt werden, wie die unterschiedlichen PDE (insbesondere PDE3 und PDE4) die kardiale Kontraktilität sowie die Sensibilität kardialer  $\beta$ -AR regulieren.

Am menschlichen Herzen finden sich  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR und  $\beta_3$ -AR. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die langfristige Stimulation kardialer  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR unterschiedliche Effekte auf das kardiale Remodeling haben. Die konstante Stimulation des  $\beta_1$ -AR führt in Kardiomyozyten unabhängig von der Proteinkinase A (PKA) zu einer Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) (Zhu et al., 2003) (Abbildung 1). Diese vermittelt im weiteren Verlauf eine myokardiale Hypertrophie, Fibrose, Nekrose und Apoptose. Auch die kardiomyozytäre Überexpression von  $G_s$  (Iwase et al., 1996) induziert eine Herzinsuffizienz. Im Gegensatz dazu hatte die  $\beta_2$ -AR Stimulation anti-apoptotische Effekte, die durch das inhibitorische G-Protein ( $G_i$ ) mediiert waren (Xiao et al., 2004). Dieses Signal wird durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von  $G_i$  mediiert und führt konsekutiv zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und somit zu einer Phosphorylierung des anti-apoptotischen Akt (Chesley et al., 2000; Zhu et al., 2001).



mit ACE-Hemmern und Diuretika betrug in den meisten Studien etwa 35% (Bristow, 2011). Bisoprolol und Metoprolol gelten als  $\beta_1$ -selektive  $\beta$ -Blocker der zweiten Generation, während Carvedilol ein  $\beta$ -Blocker der 3. Generation ist, da er zusätzlich zur  $\beta$ -Blockade noch vasodilatierende Eigenschaften besitzt. Diese werden auf die Blockade von  $\alpha$ -AR und/oder durch anti-oxidative Effekte der Substanz zurückgeführt (Bristow, 2011; Flesch et al., 1999). Im Rahmen der COMET Studie wurden die Effekte von Carvedilol bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz gegen die von Metoprolol Tartrat verglichen, und tatsächlich führte die Therapie mit Carvedilol zu einer stärkeren Senkung der Gesamtsterblichkeit gegenüber Metoprolol (COMET, (Poole-Wilson et al., 2003)). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass in der COMET Studie unretardiertes Metoprolol Tartrat verwendet wurde, welches in der initialen MDC Studie (Waagstein et al., 1993) zu keiner Überlebensverlängerung bei Patienten mit Herzinsuffizienz führte, während Metoprolol Succinat in einer Formulierung mit „Zero order kinetic“ (ZOK) eine 35%ige Senkung der Sterblichkeit in der MERIT Studie herbeiführte (1999). Aus diesem Grunde sind die Daten der COMET Studie umstritten, und die Leitlinien zur Therapie der Herzinsuffizienz sehen eine Therapie mit Metoprolol Succinat gleichwertig zu der mit Carvedilol (McMurray et al., 2012)).



**Abbildung 2:** Circulus vitiosus der Aktivierung neuroendokriner Kompensationsmechanismen bei der Herzinsuffizienz. SNS, sympathisches Nervensystem; RAAS, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; BB,  $\beta$ -Blocker; ACEI, ACE-Inhibitoren.

### 2.2.5. Unterschiede zwischen Metoprolol und Carvedilol

Trotz vergleichbarer Effekte dieser drei  $\beta$ -Blocker auf die Sterblichkeit bei Patienten mit Herzinsuffizienz weisen diese  $\beta$ -Blocker grundsätzlich unterschiedliche pharmakologische und somit auch hämodynamische Profile auf. In dieser Hinsicht wurden insbesondere Carvedilol und Metoprolol miteinander verglichen. In der sog.  $\beta$ -Blocker Umsetz Studie ( $\beta$ -BUMS; (Maack et al., 2001)), die in einem Überkreuz Format („cross-over design“) durchgeführt wurde, wurde beobachtet, dass Patienten, die von Carvedilol auf eine äquivalente Dosis von Metoprolol Succinat innerhalb eines Tages umgesetzt wurden, diesen Wechsel deutlich schlechter vertrugen als umgekehrt Patienten, die von Metoprolol Succinat auf Carvedilol umgesetzt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür wurde durch die spätere Beobachtung geliefert, dass Carvedilol ein nahezu irreversibles Bindungsverhalten an kardialen  $\beta$ -AR aufweist, so dass trotz Elimination von Carvedilol aus dem Plasma von gesunden Probanden (Halbwertszeit ~5-6 Stunden) nach 44 Stunden noch immer eine partielle  $\beta$ -Blockade *in vivo* nachzuweisen war (Kindermann et al., 2004). Erste Hinweise auf dieses irreversible Bindungsverhalten von Carvedilol, aber nicht Metoprolol, an kardialen  $\beta$ -AR, hatten bereits vorher Experimente an neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* geliefert (Flesch et al., 2001).

Im Rahmen der Überkreuz-Studie an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Maack et al., 2001) wurden bei einem Teil der Patienten Dobutamin Stress-Echokardiographien durchgeführt. Dobutamin ist primär ein  $\beta_1$ -AR Agonist, verfügt aber auch über  $\beta_2$ -AR und  $\alpha$ -AR stimulierende Eigenschaften, die sich hinsichtlich des peripheren Gefäßwiderstands weitgehend aufheben (Ruffolo, 1987). Es dominiert daher der  $\beta_1$ -AR vermittelte positiv inotrope und chronotrope Effekt, der einen Anstieg des Herzzeitvolumens (HZV) mit konsekutiver reflektorischer Senkung des endogenen Sympathikotonus nach sich zieht, was die Abnahme des peripheren Gefäßwiderstands nach Dobutamin Gabe erklärt. Interessanterweise wurde bei Patienten mit Herzinsuffizienz, die chronisch mit Carvedilol oder Metoprolol behandelt wurden, ein identischer Anstieg des Herzzeitvolumens (HZV) um ca. 40% nach 40  $\mu$ g/kg Körpergewicht Dobutamin intravenös beobachtet (Maack et al., 2001). Während dieser Anstieg des HZVs bei Metoprolol behandelten Patienten primär durch einen Anstieg der Herzfrequenz, aber nicht des Schlagvolumens bedingt war, so war er bei Patienten mit Carvedilol auf einen moderateren Anstieg der

Herzfrequenz, aber auch des Schlagvolumens zurückzuführen. Dies suggeriert, dass Carvedilol eher die positiv *inotropen* als die positiv *chronotropen* Effekte eines  $\beta_1$ -AR Agonisten *in vivo* verbessert. Der Mechanismus für diese differentielle Beeinflussung der kardialen Inotropie durch Carvedilol und Metoprolol ist bisher nicht identifiziert.

Die Tatsache, dass Dobutamin bei Carvedilol behandelten Patienten einen identischen Anstieg des HZV im Vergleich zu Metoprolol herbeiführen konnte, ist an sich überraschend. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist die Dichte der kardialen  $\beta_1$ -AR deutlich herabreguliert (Bristow et al., 1982a), was auf eine Phosphorylierung der Rezeptoren (durch Protein Kinase A und die  $\beta$ -AR Kinase) und die konsekutive Entkopplung vom stimulatorischen G-Protein und die Sequestrierung der Rezeptoren in „Clathrin-gecoverten Vesikeln“ mit Internalisierung der Rezeptoren zurückzuführen ist (Maack, 2012; Naga Prasad et al., 2002; Rockman et al., 2002). Diese Agonisten-induzierte Herabregulation kann durch orthosterische Antagonisten (d.h., Antagonisten, die an der gleichen Bindungsstelle wie der Agonist binden und einen kompetitiven Antagonismus mit dem Agonisten eingehen), die noch dazu einen inversen Agonismus aufweisen (also die Fähigkeit, die endogene Aktivität des Rezeptors zu reduzieren), aufgehoben werden. In Übereinstimmung mit diesem Konzept wurde beobachtet, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, die mit Metoprolol (einem orthosterischen, inversen Agonisten) behandelt wurden, die herabregulierte  $\beta$ -AR Dichte wieder hergestellt werden konnte (Gilbert et al., 1993), was mit einer Verbesserung der maximalen  $O_2$ -Aufnahme in der Spiroergometrie und somit der maximalen Belastungstoleranz korrelierte (White et al., 1995). Im Gegensatz dazu führte Carvedilol zu *keiner* Heraufregulation der  $\beta$ -AR Dichte (Gilbert et al., 1993) und auch zu keiner Verbesserung der maximalen  $O_2$ -Aufnahme (White et al., 1995) bei diesen Patienten, was (hinsichtlich der  $\beta$ -AR Dichte) Ergebnisse von *in vitro* Experimenten bestätigen konnten (Flesch et al., 2001).

Ob dies auf die persistierende Bindung von Carvedilol an  $\beta$ -AR und somit eine Erhöhung der Dissoziationskonstante für den Agonisten (bzw. experimentell den Radioliganden) oder tatsächlich auf eine fehlende Heraufregulation der Rezeptoren oder gar beides zurückzuführen ist, ist derzeit ungeklärt. In adulten Ratten-Kardiomyozyten wurde beobachtet, dass nach 24 Stunden Koinkubation von Carvedilol mit dem Agonisten Isoprenalin die *Effektivität* von Isoprenalin (in diesem

Falle die maximale Zunahme der zellulären Verkürzungsfraktion in Kardiomyozyten) bei leicht verringerter Affinität der Rezeptoren gegenüber Zellen, die nur mit Isoprenalin behandelt wurden, wieder hergestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu führte die Koinkubation von Metoprolol mit Isoprenalin zu einer Rekonstitution der Effektivität *und* der Affinität der  $\beta$ -AR (Flesch et al., 2001).

Diese *in vitro* (Flesch et al., 2001) und *in vivo* Daten (Maack et al., 2001) zeigen, dass Carvedilol, obwohl es nicht in der Lage ist, die kardialen  $\beta$ -AR bei Patienten mit Herzinsuffizienz wieder herauf zu regulieren (Gilbert et al., 1993), dennoch zu einer vollständigen Rekonstitution der kardialen Inotropie *in vivo* und *in vitro* führen kann. Im Sinne des konventionellen Konzeptes der  $\beta$ -AR Desensibilisierung ist dies jedoch nicht ohne weiteres mit der fehlenden Rezeptor Heraufregulation vereinbar, sofern nicht auf Post-Rezeptor Niveau eine Sensibilisierung stattfindet. Es muss daher andere Mechanismen geben, durch die Carvedilol kardiale  $\beta$ -AR wieder resensibilisieren kann.

Das **Hauptziel der vorliegenden Arbeit** ist es demnach, diesen Mechanismus weiter aufzuklären.

### **2.2.6. Phosphodiesterasen**

Wie bereits erwähnt, sind die Phosphodiesterasen (PDE) für die zeitliche und räumliche Begrenzung des cAMP Anstiegs nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation verantwortlich. PDE sind Enzyme, die cAMP und cGMP intrazellulär degradieren. Es sind mehr als 11 Familien identifiziert worden, die allesamt eine bestimmte Struktur, Aktivität, Expression und Verteilung im Gewebe aufweisen. Die PDE 3, 4 und 5 sind hierbei an speziellen Lokalisationen im Herzen und in der glatten Muskulatur der Koronarien exprimiert und haben daher auch den größten Einfluss auf die kardiale Signaltransduktion und Effekte auf die kardiale Kontraktilität (Rao and Xi, 2009). Sie beeinflussen das Ausmaß, die Dauer und räumliche Ausbreitung des Anstiegs der lokalen PKA-Aktivität (Leroy et al., 2008), die eine Reihe von spezifischen Substraten phosphoryliert, die für die Kontraktilität verantwortlich sind (Conti and Beavo, 2007; Cooper, 2005; Houslay et al., 2007). Den PDE 3 und 4 kommt dabei die größte Bedeutung zu, da sie für den Hauptteil der spezifischen Aktivität in Herzmuskelzellen

verantwortlich sind (Mongillo et al., 2004; Rochais et al., 2006). Besonders für die PDE4D Isoform wurde gezeigt, dass sie in Assoziation zum  $\beta$ -AR die Rezeptor induzierte cAMP Akkumulation in kardialen Myozyten reguliert (Perry et al., 2002; Richter et al., 2008). In neonatalen Rattenmyozyten konnte gezeigt werden, dass sich cAMP räumlich in Mikrodomänen anreichert und die weitere Diffusion in der Folge durch PDE limitiert wird (Zaccolo and Pozzan, 2002).

Die Regulation der PDE selbst ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die klassische Aktivierung der PDE4 wird durch die PKA mediiert, was einem negativen Feedback Mechanismus entspricht (Sette and Conti, 1996). Darüber hinaus weisen neuere Daten auch auf eine Aktivierung der PDE4 durch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) hin, da durch ihre Inhibition ein Anstieg in der cAMP-Konzentration beobachtet wurde (Crackower et al., 2002). In Tiermodellen führte die Inhibition der PI3-Kinase nach Stimulation am  $\beta_2$ -AR zu einem verstärkten adrenergen Effekt durch die Erhöhung von cAMP, die am ehesten auf den Verlust der Funktion der PDE4 zurückzuführen ist (Kerfant et al., 2007). Ob es eine direkte Interaktion der beiden Enzyme gibt, ist bislang nicht vollständig aufgeschlüsselt. Neuere Arbeiten zeigen darüber hinaus, ebenfalls an Rattenmyozyten, eine Interaktion zwischen PDE4 und dem  $\beta_1$ -AR (De Arcangelis et al., 2008). Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob PDE und PI3-Kinase einen funktionellen Einfluss auf kardiale  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR im humanen Myokard haben.

### **2.2.7. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase)**

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase, PI3K) zählt zur Familie der Lipidkinasen, welche die Phosphorylierung an der D3-Position des Inositolrings von Phosphatidylinositol katalysieren. Ihre Aktivität ist ubiquitär in eukaryontischen Zellen nachweisbar. Es ist bereits gut untersucht, dass die Aktivierung der PI3-Kinasen durch die Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und GPCRs zu einer Erhöhung von Phosphatidyl-Inositol(3)-Phosphat (PIP<sub>3</sub>) führt, welches ein potentes Signalmolekül ist, das seinerseits zur Modulation verschiedener zellulärer Effekte führt, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion, Migration, Organisation des Zytoskeletts, Membrantransportvorgänge und Apoptose (Oudit and Kassiri, 2007; Oudit et al., 2004). PI3K $\alpha$  and PI3K $\gamma$  sind die beiden Hauptformen, die

in Kardiomyozyten vorkommen (Oudit and Kassiri, 2007). Während die PI3K $\alpha$  das Herzwachstum beeinflusst (Luo et al., 2005) wird die kardiale Kontraktilität durch die PI3K $\gamma$  reguliert (Crackower et al., 2002; Kerfant et al., 2006). Diese wird nach G-Protein-Stimulation durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins aktiviert (Chesley et al., 2000; Maier et al., 1999). Es wird postuliert, dass die PI3K $\gamma$  die kardiale Kontraktilität und die elektromechanische Kopplung durch Beeinflussung des cAMP-Spiegels und die Phospholamban (PLN) Phosphorylierung reguliert (Crackower et al., 2002; Kerfant et al., 2006; Patrucco et al., 2004). In früheren Studien wurde diskutiert, dass dieser Signaltransduktionsweg allein nach Stimulation des  $\beta_2$ -AR ausgelöst wird, der neben seinen Effekten auf cAMP und Kontraktilität auch über die Phosphorylierung von Protein Kinase B (Akt) und GSK3 $\beta$  antiapoptotische Mechanismen in der Zelle reguliert (Zhu et al., 2001). 2004 beschrieb die Gruppe um Xiao et al. jedoch auch die Relevanz für den  $\beta_1$ -AR (Leblais et al., 2004). An Rattenkardiomyozyten kam es hier nach selektiver Stimulation des  $\beta_1$ -AR und nach Hemmung der PI3-Kinase mit LY294002 zu einer Verstärkung der zellulären Verkürzungsfraction.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass es ein enges Zusammenspiel zwischen  $\beta$ -AR, PDEs und der PI3K gibt, deren Relevanz für humanes Myokard noch fast vollkommen unerforscht ist, insbesondere im Hinblick auf die Regulation der kardialen Kontraktilität. Da bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz  $\beta_1$ -AR desensibilisiert sind, spekulierten wir, dass die PI3-Kinase und PDEs an der Desensibilisierung von  $\beta_1$ -AR in menschlichem Myokard beteiligt sein könnten. Die vorherigen Ausführungen könnten ein Beleg dafür sein, dass die genannten Signaltransduktionswege durchaus einen Einfluss auf die Sensibilität kardialer  $\beta$ -AR für endogene Agonisten wie Adrenalin und Noradrenalin haben könnten.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher,

- 1.) zu klären, welche Mechanismen zur Desensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR beitragen.
- 2.) die Rolle der verschiedenen PDE und der PI3-Kinase zu klären.
- 3.) Darüber hinaus soll geklärt werden, durch welchen Mechanismus Carvedilol zu einer Resensibilisierung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs am menschlichen Herzen führt, da dies nicht durch die Wieder-Heraufregulation kardialer  $\beta$ -AR erklärbar ist.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Materialien**

#### **3.1.1. Materialien für die Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln**

Die Experimente wurden an humanen rechtsatrialen Muskel-Trabekeln durchgeführt und die isometrische Kontraktionskraft wurde detektiert. Das Gewebe wurde von Patienten entnommen, die im Rahmen einer Herz-Thorax-chirurgischen Operation behandelt wurden, die den Anschluss einer Herzlungenmaschine erforderte (insbesondere aortokoronare Bypass Operation, Aortenklappen- bzw. Mitralklappenoperation). Bei der Kanülierung des rechten Vorhofs wird in diesem Zusammenhang das rechte Herzohr abgetrennt. Die Verwendung von Patientenmaterial erfolgte nach vorheriger Genehmigung durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Nr. 131/00).

#### **3.1.2. Material für die Western-Blot Analyse**

Zur Detektion der Phosphorylierung von Akt wurden Western-Blot Experimente an Trabekeln, die vorher funktionell untersucht wurden, durchgeführt.

#### **3.1.3. Material für die Bestimmung des $\beta$ -AR Polymorphismus**

Nach der Präparation der Herzmuskeltrabekel (s.u.) wurde das restliche Gewebe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Aus diesem Gewebe entnahmen wir weiteres Material für die Genotypisierung der Rezeptor-Polymorphismen. Wir isolierten zuerst die DNA aus dem vorliegenden Material, um anschließend eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des entsprechenden Genlokus durchzuführen. Aus diesem PCR-Produkt wurde dann anschließend der Polymorphismus für den  $\beta$ -AR bestimmt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. P. Nürnberger und der Mitwirkung von Herrn Dr. M. R. Toliat (Cologne Center for Genomics, Universität zu Köln).

### **3.1.4. Substanzen zur Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln (Tyrode Lösung)**

#### **Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München:**

- L (+)-Ascorbinsäure, MG 176
- D (+)-Glukose, MG 180
- Kaliumchlorid (KCl), MG 75
- Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), MG 181
- Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O), MG 203
- Natriumchlorid (NaCl), MG 58
- Natriumhydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), MG 138
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), MG 84
- Salzsäure (HCl), 37%, MG 36

### **3.1.5. Substanzen für die Kontraktionskraftmessung an rechtsatrialen Trabekeln**

#### **Astra Chemicals, Wedel, Deutschland:**

- Metoprolol, MG 684

#### **Merck KGaA, Darmstadt, Germany:**

- LY294002 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride), MG 348

#### **Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany**

- Adrenalin Hydrochlorid, MG 219
- CGP 207.12A (2-Hydroxy-5-(2-hydroxy-3-(4-((1-methyl-4-trifluormethyl)-1H-imidazol-2-yl)-phenoxy-propyl)-aminoethoxyl)-benzamid Hydrochlorid), MG 591
- EHNA (erythro-9-Amino-β-hexyl-α-methyl-9H-purine-9-ethanol hydrochloride), MG 313
- Forskolin (7β-Acetoxy-8,13-epoxy-1α,6,9α-trihydroxylabd-14-en-11-on), MG 411
- IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), MG 222

- ICI 118.551 (erythro-(±)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol Hydrochlorid), MG 313
- IGF 1, MG 7,6 kDa
- Isoproterenol (Isoprenalin), MG 248
- L-NAME, MG 270
- Milrinone, MG 211
- Noradrenalin, MG 169
- Phenoxybenzamin, MG 340
- Rolipram, MG 275
- Wortmannin MG 428

### 3.1.6. Substanzen und Materialien zur Durchführung der Gelelektrophorese und des Western-Blots

- Acrylamid
- Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
- Ammoniumperoxidsulat ( APS) (  $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ), MG 228
- Bromphenolblau
- DC Protein Assay Reagent A, Bio-Rad, Munich, Germany
- DC Protein Assay Reagent B, Bio-Rad, Munich, Germany
- DCS Marker
- Dithiothreitol ( DTT) (  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ), MG 154
- ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham, GE Healthcare
- Glycerol (  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), MG 92
- Glycin (  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ), MG 75
- Methanol (  $\text{CH}_4\text{O}$ ), MG 32, VWR, Darmstadt, Germany
- PBS
- Ponceau S (  $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$ ), MG 760
- Sodium Dodecyl Sulfate ( SDS) (  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ), MG 288
- Tetramethylethylendiamin ( Temed) (  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2$ ), MG 116
- TRIS-Ammonium, MG 349
- TRIS-HCl, MG 156
- Tween 20 (  $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ), MG 1227
- $\beta$ -Mercaptoethanol, MG 78

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Präparation rechtsatrialer Trabekel**

Das Herzmuskelgewebe wurde unmittelbar nach intraoperativer Entnahme in eisgekühlter St. Thomas Kardioplegielösung (Natriumchlorid: 110 mmol/l; Kaliumchlorid: 16 mmol/l; Natriumhydrogencarbonat: 10 mmol/l; Magnesiumchlorid: 16 mmol/l; Calciumchlorid: 1,2 mmol/l) ins Labor transportiert. Dort erfolgte die Entnahme der Trabekel in 4°C kalter Tyrode. Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (in mmol/l): NaCl 136.9; KCl 5.4; MgCl<sub>2</sub> 1.05; CaCl<sub>2</sub> 1.8; NaHCO<sub>3</sub> 22.6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.42; Glukose 5.0; Ascorbinsäure 0.28; Na<sub>2</sub>EDTA 0.05. Der pH wurde auf 7.4 eingestellt. Es wurde ausschließlich demineralisiertes und bidestilliertes Wasser zur Herstellung der Tyrodelösung verwendet. Die rechtsatrialen Trabekel wurden so atraumatisch wie möglich in Faserrichtung mit Pinzette und Präparierschere aus dem umgebenden Myokard herauspräpariert und von anhaftendem Bindegewebe befreit. Sie waren ca. 4-6 mm lang und hatten einen Durchmesser von ca. 1-2mm. Die Proben wurden dabei weder verletzt noch unter Zug gesetzt. Für die funktionellen Experimente wurden nur Trabekel benutzt, die unter basalen steady-state Bedingungen mindestens 1mN Kraft entwickelten.

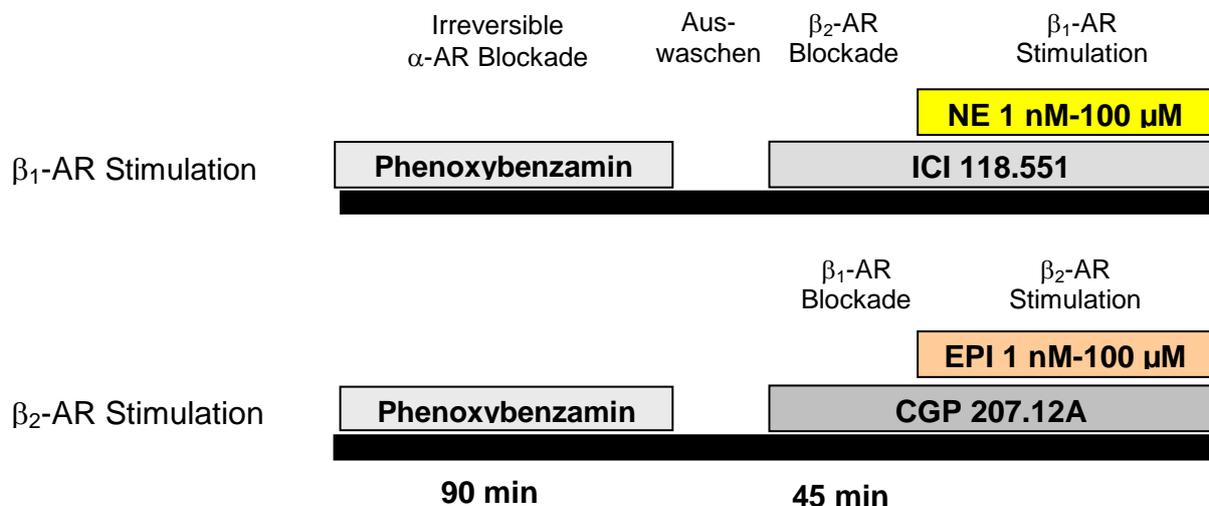
### **3.2.2. Versuchsdurchführung**

Die Vorhoftrabekel wurden zur Messung der isometrischen Kontraktionskraft in zweikammerige Organbäder eingebracht und dort an zwei Haken befestigt. Die innere Kammer enthielt 50 bzw. 75 ml konstant mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> auf 95% O<sub>2</sub>) begaster Tyrodelösung mit einem pH-Wert von 7.4. Die Temperatur wurde über die äußere Kammer mittels Heizthermostaten konstant bei 37°C gehalten. Die Präparate wurden zu Beginn des Experimentes vorgespannt, bis die entwickelte Kraft maximal war (meist 5-7 mN). Die elektrische Stimulation erfolgte über zwei Platinelektroden, als Reizgeräte dienten für die 50ml Anlage ein HSE (Hugo Sachs Electronics) Typ 216 Stimulator und für die 75ml Anlage wurde ein computergestütztes Stimulationsprogramm benutzt, das über einen „Current Stimulator“ von FMI (Föhr Medical Instruments) Mod. STI-08 mittels eines Verstärkers von HBM (Hottinger Baldwin Messtechnik, Germany) Mod. 226 die Trabekel stimulierte. Es wurden Rechteckimpulse mit einer Reizdauer von 5 ms bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz verwendet. Die von den Herzmuskeltrabekeln entwickelte isometrische

Kontraktionskraft wurde über einen induktiven Kraftaufnehmer (Fa. Fleck, Mainz, Deutschland & Fa. HBM, Hottinger Baldwin Messtechnik, Germany) gemessen. Mit dem Computerprogramm In Vitro Dat (Version 3.1) wurden alle Daten, bis hin zur Einzelkontraktion, festgehalten. Die Äquilibrierungszeit bis zur vollständigen mechanischen Stabilisierung betrug 60-90 Minuten (min).

### 3.2.3. Sequenzielle $\alpha$ - und $\beta$ -Blockade

Die Trabekel wurden sequenziell sowohl am  $\alpha$ - als auch am  $\beta$ -AR blockiert. Hierfür wurde das bewährte Protokoll von Alberto Kaumann et al. verwendet (Kaumann and Lemoine, 1987). Hierbei wird der Trabekel zunächst für 90 min mit Phenoxybenzamin inkubiert, was zum einen endogene Katecholamine depletiert und zum anderen  $\alpha$ -AR irreversibel blockiert. Die Substanz wird anschließend wieder ausgewaschen, indem man die Tyrode in dem jeweiligen Bad mehrfach wechselt. Anschließend wurde der  $\beta_2$ -AR mit ICI 118.551 bzw. der  $\beta_1$ -AR mit CGP 207.12A selektiv blockiert (Abbildung 3). Zur Stimulation von  $\beta_1$ -AR wurde Noradrenalin nach vorheriger  $\beta_2$ -AR Blockade verwendet, während zur Stimulation von  $\beta_2$ -AR Adrenalin nach vorheriger Blockade von  $\beta_1$ -AR verwendet wurde. Diese Experimente wurden in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener PDE- und PI3K-Inhibitoren bzw.  $\beta$ -Blocker durchgeführt.



**Abbildung 3:** schematische Übersicht über den Versuchsaufbau (nach Kaumann AJ, Lemoine H, 1987)

### **3.2.4. Durchführung der Western-Blot Experimente**

#### **3.2.4.1. Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Gelelektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-Gelen) mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Das Trenngel wurde zuerst in eine Minigelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine scharfe Gelfront zu erhalten. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit 5 µl SDS-Stop-Puffer (9 Vol. SDS-Stop-Puffer Stocklösung, 1 Vol. β-Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht und bis zum Probenauftrag auf Eis gelagert. Für den Gellauf wurde 1x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris/HCL, pH 8,3 / 2,5 M Glycin / 1% SDS) verwendet. Solange sich die Proben im Sammelgel befanden, wurde eine Spannung von 60 V angelegt, und sobald sich die Proben im Trenngel befanden, wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Als Marker wurde der Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas # SM0441) verwendet.

- **Zusammensetzung des 10%igen Trenngels:**

4 ml H<sub>2</sub>O  
3,3 ml 30% Acryl-Bisacrylamid Mix  
2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8  
0,01 ml 10% SDS  
0,01 ml Ammonium Persulfat  
0,002 ml TEMED

- **Zusammensetzung des Sammelgels:**

2,1 ml H<sub>2</sub>O  
0,5 ml 30% Acryl-Bisacrylamid Mix  
0,38 ml 1,5M Tris pH 8,8  
0,003 ml 10% SDS  
0,003 ml Ammonium Persulfat  
0,0002 ml TEMED

#### 3.2.2.4. Western Blot von SDS-Gelen

Nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden diese im Flüssigtransfer-Verfahren in einer Blottingapparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) bei einer Stromstärke von 400 mA und einer Laufzeit von etwa 120 min auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) übertragen. Für den Transfer wurde ein „Sandwich“ luftblasenfrei aus einem Schwamm, drei Lagen aus 3MM-Wattman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel, erneut drei Lagen 3MM-Wattman-Papier und einem Schwamm in die mit Transferpuffer befüllte Transferkammer gespannt. Die Membran war zu der Anoden- und das SDS-Gel zu der Kathodenseite orientiert.

- **Zusammensetzung des Transferpuffers:**

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS (w/v)

10% Methanol (v/v)

#### 3.2.4.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen wurde exakt nach der Vorschrift von Sigma Anti-Flag M2 Monoclonal Antibody durchgeführt.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

*Primärantikörper:*

**FLAG-M2:** (Sigma # F3165) Dieser Primärantikörper wurde in der Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

*Sekundärantikörper:*

**Anti-Maus IgG** ist ein polyklonaler Antikörper, der von der Firma Sigma (# A-4416) bezogen und in einer Verdünnung von 1:20.000 eingesetzt wurde.

Zum Nachweis des entstandenen Komplexes aus nachzuweisendem Protein, Primär- und Sekundärantikörper wurde das ECL<sup>Plus</sup>-System (Firma Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) verwendet. Hierzu wurde 1 ml der ECLplus-

Gebrauchslösung gleichmäßig auf der Nitrocellulose-Membran verteilt und 5 min inkubiert. Die Gebrauchslösung setzt sich wie folgt zusammen:

40 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B (ECLplus-Kit). Danach wurde die Membran mit Whatman-3MM-Papier abgetupft und unmittelbar danach wurde die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

### **3.3. Statistische Analyse**

Die Regressionsanalyse der Kurven wurde mit dem Computerprogramm GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) durchgeführt. Die Konzentration, bei der 50% des Effektes erreicht sind ( $EC_{50}$ ) - wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse bestimmt. Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert (MW) und dazugehöriger Standardabweichung des Mittelwertes ( $SEM = MW/\sqrt{n}$ ) aus den jeweiligen Einzelwerten berechnet ( $n$ =Anzahl der Experimente). Die statistische Signifikanz wurde durch ANOVA-Analyse oder t-Tests ermittelt. Ein p-Wert  $<0.05$  wurde als signifikant angesehen.

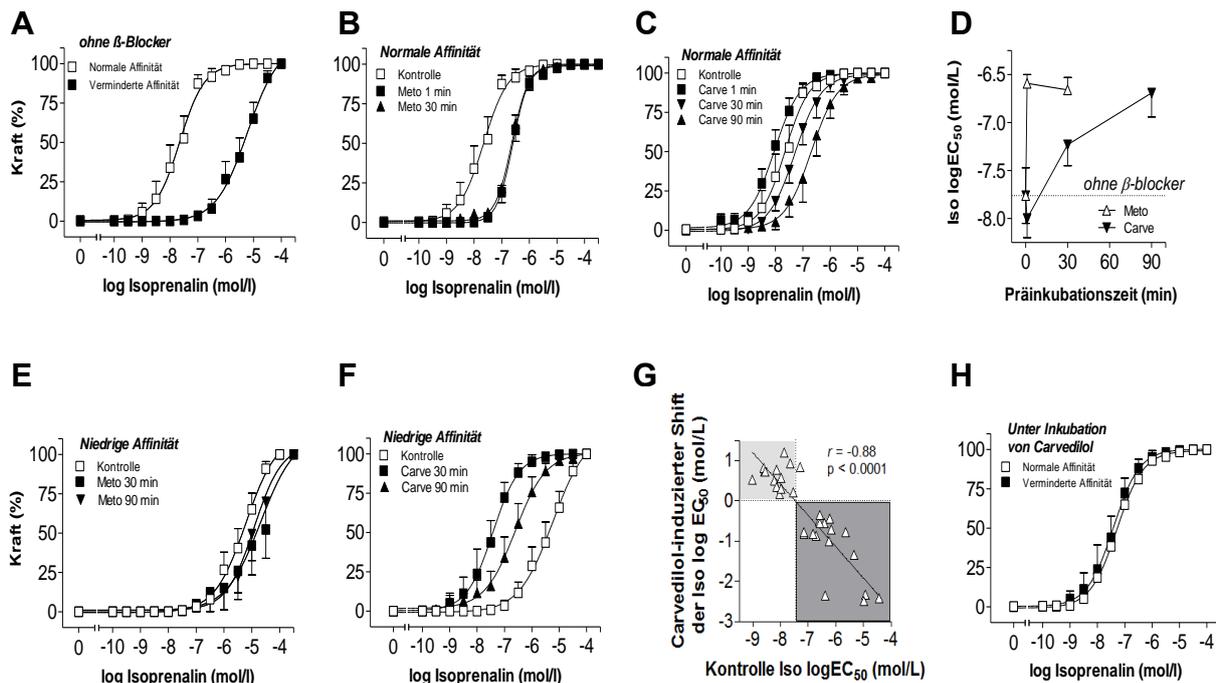
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorarbeiten

In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe wurde beobachtet, dass Carvedilol, aber nicht Metoprolol ein irreversibles Bindungsverhalten an kardialen  $\beta$ -AR aufweist (Flesch et al., 2001; Kindermann et al., 2004). Um zu testen, ob diese langsamere *Dissoziation* von Carvedilol auch mit einer langsameren Kinetik der *Rezeptor-Assoziation* vergesellschaftet ist, wurden isolierte humane Vorhoftrabekel mit aufsteigenden Konzentrationen des nicht selektiven  $\beta$ -AR Agonisten Isoprenalin inkubiert (*Diese Experimente sind für das Verständnis der weiteren Experimente wichtig und werden daher hier erläutert. Die Untersuchungen sind von Herrn Philip Böhmer aus unserer Arbeitsgruppe und nicht von mir selbst durchgeführt worden*). Die Experimente wurden in der Abwesenheit und Gegenwart von äquipotenten Konzentrationen von Carvedilol (10 nmol/L) oder Metoprolol (1  $\mu$ mol/L) durchgeführt und mit einer Gruppe ohne  $\beta$ -Blocker Zugabe verglichen. Die  $\beta$ -Blocker wurden hierbei 1, 30 oder 90 min vor Zugabe von Isoprenalin vorinkubiert.

#### 4.1.1. Unterschiedliche Sensibilität kardialer $\beta$ -AR für Isoprenalin

Isoprenalin führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Kontraktionskraft in allen Trabekeln. In der Abwesenheit von  $\beta$ -Blockern (Kontrollgruppe) zeigten sich hierbei jedoch überraschenderweise eine deutliche Variabilität der  $EC_{50}$  Werte für Isoprenalin. Während die  $EC_{50}$  Werte in der einen Gruppe um 20 nmol/L lagen, war eine zweite Gruppe von Trabekeln (von anderen Patienten) deutlich desensibilisiert gegenüber dem positiv inotropen Effekt von Isoprenalin. Die Einteilung in Trabekel aus *normal sensitivem* und *desensibilisiertem Vorhofmyokard* erfolgte entlang des Medians der  $\log EC_{50}$  für Isoprenalin der Gesamtgruppe ( $\log EC_{50} = -7.5$  mol/L) (Abbildung 4A).



**Abbildung 4:** Konzentrationsabhängige Zunahme der kardialen Kontraktilität in menschlichen Vorhoftrabekeln durch Isoprenalin in der Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von Carvedilol (10 nmol/L) oder Metoprolol (1  $\mu$ mol/L) nach 1-, 30- und (im Falle von Carvedilol) 90-minütiger Vorinkubation. Es ergab sich eine heterogene Sensibilität kardialer  $\beta$ -AR für Isoprenalin. Es wurden die Vorhofgewebe daher entlang des Medians der Isoprenalin  $\log EC_{50}$  (-7.5 M) in solche mit normaler und reduzierter Sensibilität eingeteilt. **A:** Effekt von Isoprenalin in Geweben mit normaler und reduzierter Sensibilität. **B** und **C:** Zeit-abhängige Antagonisierung des Isoprenalin Effektes durch Metoprolol (**B**) oder Carvedilol (**C**) in normal affinen Vorhofgewebe. **D:** Isoprenalin  $\log EC_{50}$  aufgetragen gegen die Zeit der Vorinkubation von Metoprolol oder Carvedilol. **E** und **F:** Zeit-abhängige Beeinflussung des Isoprenalin Effektes durch Metoprolol (**E**) oder Carvedilol (**F**) in Trabekeln mit niedriger Affinität. **G:** Carvedilol-induzierte Verschiebung der Isoprenalin  $\log EC_{50}$  (nach 30 min Vorinkubation) in Abhängigkeit der Isoprenalin  $\log EC_{50}$ . **H:** Effekt von Isoprenalin nach 30 min Vorinkubation mit Carvedilol in Vorhöfen mit normaler oder reduzierter Sensibilität kardialer  $\beta$ -AR für Isoprenalin in der jeweiligen Kontrollgruppe.

#### 4.1.2. Carvedilol weist eine langsamere Assoziation mit $\beta$ -AR auf und resensibilisiert Trabekel aus desensibilisiertem Vorhofmyokard

In den Vorhöfen mit normaler  $\beta$ -AR Affinität zeigte die Präinkubation mit Metoprolol für 1 oder 30 Minuten erwartungsgemäß eine sofort einsetzende Rechtsverschiebung der Isoprenalin  $EC_{50}$  (Abbildung 4B), mit identischen Effekten nach 1 oder 30 min Vorinkubation. Im Gegensatz hierzu zeigte die Präinkubation mit Carvedilol in der gleichen Gruppe der Vorhöfe mit normaler  $\beta$ -AR Sensitivität eine zeitabhängige Rechtsverschiebung der Isoprenalin  $EC_{50}$  (Abbildung 4C). Auffällig war hierbei, dass die nur kurze Inkubation von Carvedilol für eine Minute sogar eine leichte Linksverschiebung der Isoprenalin  $EC_{50}$  induzierte (Abbildung 4C). Trägt man die  $\log EC_{50}$  Werte für Isoprenalin in der Abwesenheit und Gegenwart von Metoprolol oder Carvedilol gegen die Zeit der Präinkubation auf, so zeigt sich deutlich die

wesentlich langsamere Assoziations-Kinetik für Carvedilol gegenüber Metoprolol (Abbildung 4D). In der Gruppe der Vorhöfe, die eine reduzierte  $\beta$ -AR Sensibilität gegenüber Isoprenalin aufwiesen, zeigte Metoprolol keine weitere Rechtsverschiebung der Isoprenalin Konzentrations-Wirkungs Kurve (Abbildung 4E). Im Gegensatz dazu bewirkte jedoch sowohl die 30- als auch 90-minütige Vorinkubation mit Carvedilol eine substantielle Sensibilisierung der  $\beta$ -AR (Abbildung 4F). Je stärker die  $\beta$ -AR in dem jeweiligen Gewebe desensibilisiert waren, desto stärker verschob Carvedilol die  $\log EC_{50}$  für Isoprenalin wieder nach links zurück (Abbildung 4G). Auffällig war hierbei, dass nach 30 min Vorinkubation mit Carvedilol die  $\log EC_{50}$  Werte für Isoprenalin in Vorhöfen mit normaler  $\beta$ -AR Sensibilität identisch mit denen waren, in denen die  $\beta$ -AR in der Kontrollgruppe desensibilisiert waren (Abbildung 4H). Diese Daten weisen darauf hin, dass Carvedilol die Ursache für die unterschiedliche Sensibilität der beiden Gruppe aufheben kann.

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich insbesondere 2 weitere Fragen, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren:

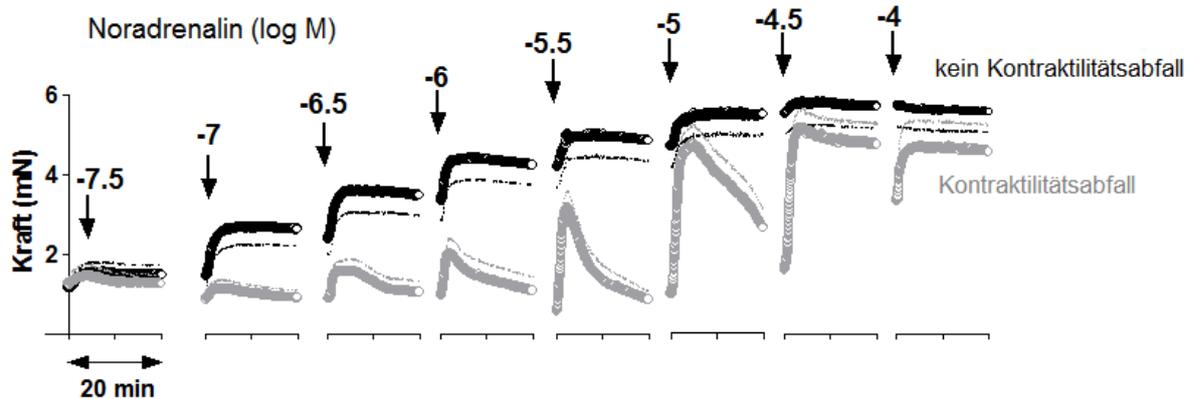
1. Welche Mechanismen führen zu der beobachteten Desensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR?
2. Wie kann Carvedilol kardiale  $\beta$ -AR resensibilisieren?

#### **4.2. Kardiale Kontraktilität nach selektiver Stimulation von $\beta_1$ -AR und $\beta_2$ -AR**

Um diese Fragen weiter zu ergründen, wurden  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR getrennt voneinander untersucht. Darüber hinaus verwendeten wir für die folgenden Experimente die endogenen  $\beta$ -AR Agonisten Noradrenalin und Adrenalin, entsprechend einem bereits etablierten Protokoll von Kaumann und Lemoine (Kaumann and Lemoine, 1987). Hierbei werden durch Vorbehandlung der Trabekel mit Phenoxybenzamin für 90 min  $\alpha$ -AR irreversibel geblockt und die endogenen Katecholaminspeicher entleert. Anschließend wurden  $\beta_2$ -AR mit ICI-118.551 geblockt und die nicht geblockten  $\beta_1$ -AR mit Noradrenalin stimuliert. Für die  $\beta_2$ -AR Stimulation wurden zunächst  $\beta_1$ -AR mit CGP-207.12A geblockt und die nicht blockierten  $\beta_2$ -AR mit Adrenalin stimuliert (schematisch gezeigt in Abbildung 3).

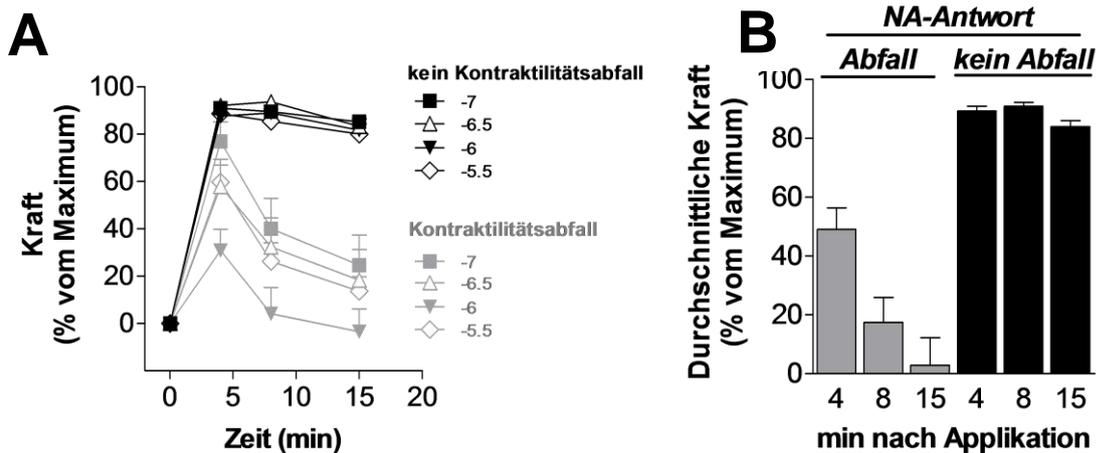
#### 4.2.1. Biphasisches Ansprechen auf $\beta_1$ -AR Stimulation ist mit Rezeptor Desensibilisierung assoziiert

Die Stimulation kardialer  $\beta_1$ -AR führte zu einer konzentrations-abhängigen Zunahme der Kontraktilität. In der Hälfte der Fälle ( $n=33$  von  $n=66$  Vorhöfen) kam es nach dem initial positiv inotropen Effekt zu einer Abnahme der Kontraktionskraft, wohingegen in der anderen Hälfte der Trabekel die Kraft über 20 Minuten lang weitgehend konstant blieb (Abbildung 5).



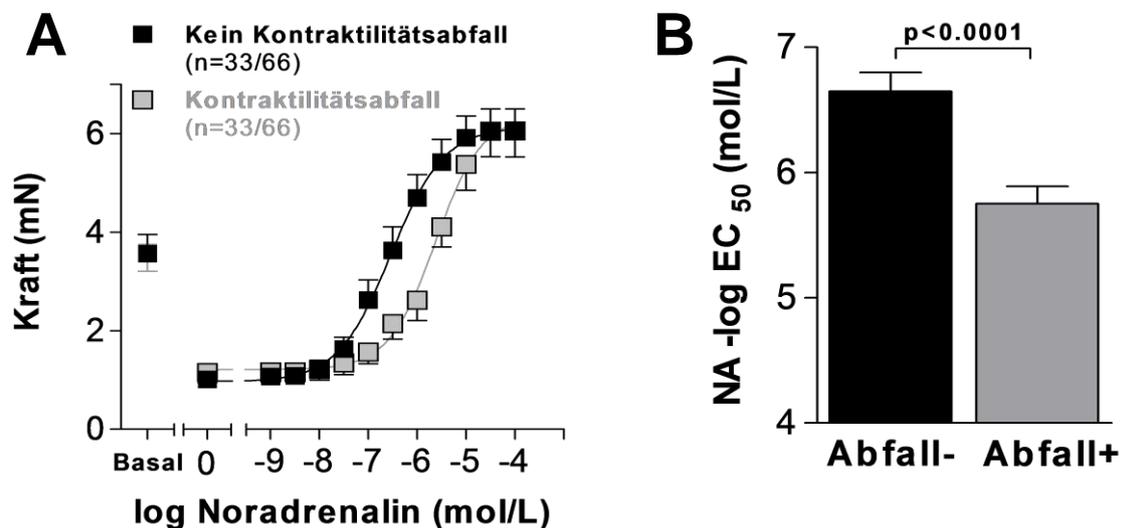
**Abbildung 5:** Verlauf der Kontraktionskraft (in mN) bei kumulativen Noradrenalin-Konzentrationen über einen Zeitraum von jeweils 20 min pro Konzentration. Dargestellt ist die Gruppe von Trabekeln, die nach dem initial positiv inotropen Effekte eine sekundäre Abnahme desselben zeigten („Kontraktilitätsabfall“;  $n=33$ ). Im Gegensatz dazu blieb in der anderen Gruppe die Kontraktilität nach Erreichen des Maximums weitgehend konstant („kein Kontraktilitätsabfall“;  $n=33$ ). Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Noradrenalin Applikationen, deren Konzentrationen (in log M) darüber angezeigt sind. Es sind von allen Experimente die ersten 20 min des Kraftverlaufs vereinheitlicht dargestellt und gemittelt.

Die Rate des Kraftabfalls innerhalb dieses Zeitintervalls war am ehesten vergleichbar bei den Noradrenalin Konzentrationen zwischen  $0,1$  bis  $3 \mu\text{mol/L}$ . Wir mittelten daher die Kraftabnahmen dieser 4 Konzentrationen jeweils bei 4, 8 und 15 Minuten nach Applikation des Agonisten in % des Maximums, um einen Konzentrations-übergreifenden Parameter dieses Phänomens zu erhalten, der dann innerhalb der verschiedenen Gruppen verglichen werden konnte (Abbildung 6A und B).



**Abbildung 6:** **A:** Zeitlicher Verlauf der Kontraktionskraft in % des maximal erreichten Effektes nach Zugabe einer jeweiligen Konzentration in Trabekeln mit und ohne eine Abnahme der Kontraktionskraft (jeweils n=33 pro Gruppe) bei kumulativen Noradrenalin (NA) Konzentrationen. **B:** Mittelwerte der prozentual verbliebenen Kraft 4, 8 und 15 min nach Applikation von Noradrenalin.

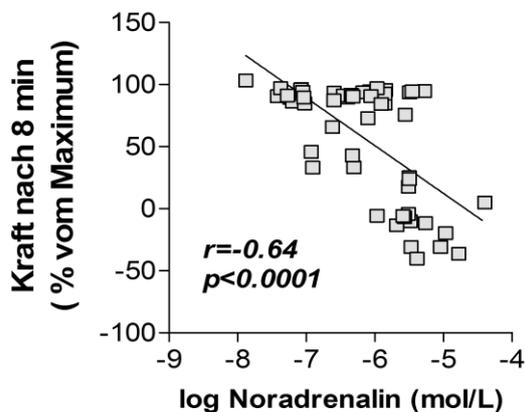
Es zeigte sich, dass die Trabekel, die einen biphasischen Verlauf der Kontraktilität mit einer deutlichen Abnahme der Kraft nach Erreichen des initialen Maximums aufwiesen, eine Desensibilisierung gegenüber Noradrenalin aufwiesen (NA logEC<sub>50</sub>: Abfall-, -6.7±0.2 M; Abfall+, -5.8±0.1 M; p<0.0001; Abbildungen 7A und B).



**Abbildung 7:** **A,** Konzentrations-abhängige Zunahme des Kontraktionskraftmaximums nach Zugabe von Noradrenalin in der Gruppe der Trabekel mit (Abfall+) und ohne sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft nach Erreichen des Maximums (Abfall-). **B,** zugehörige -logEC<sub>50</sub> Konzentration in beiden Gruppen (n=33 pro Gruppe).

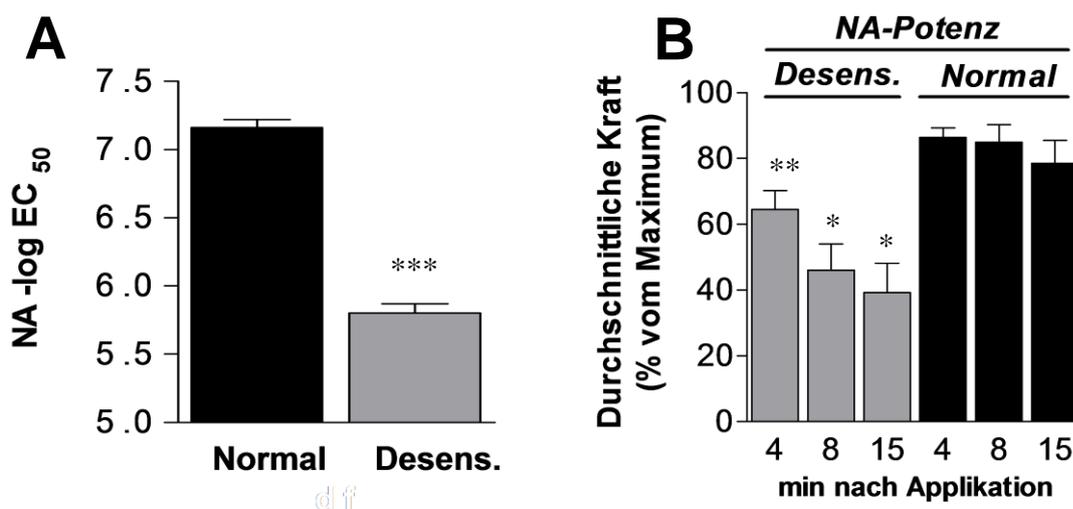
Trägt man die gemittelten Kraftwerte, die nach 8 Minuten erreicht worden sind, gegen die Noradrenalin Potenz auf, kann man eine inverse Korrelation beobachten.

Das bedeutet, dass je stärker die Noradrenalin Potenz verringert war, desto stärker war auch der Abfall der Kraft nach 8 Minuten (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Inverse Korrelation zwischen Noradrenalin Potenz und prozentalem Kraftabfall nach 8 min.

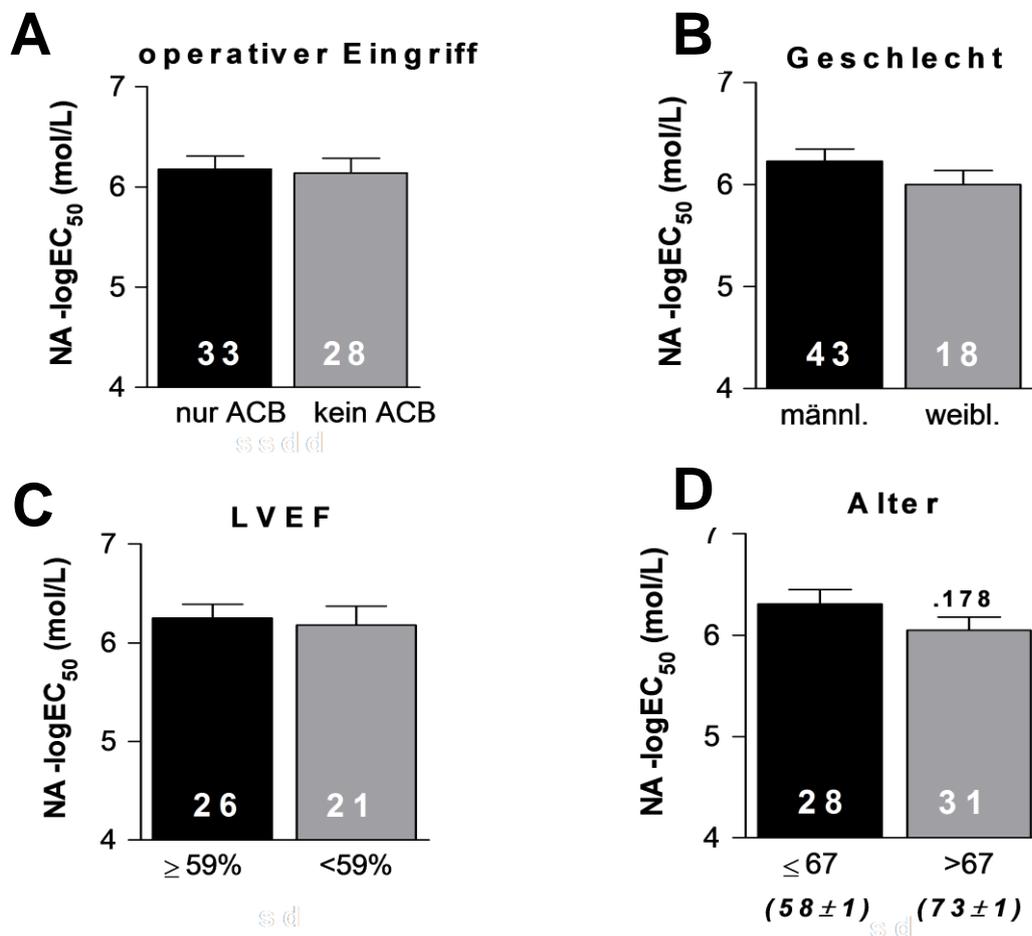
Allerdings beobachteten wir auch Trabekel, die desensibilisiert waren, ohne dass ein Abfall der Kraft im Verlauf aufgetreten ist. Daher haben wir zusätzlich die Trabekel aufgetrennt nach denjenigen, die eine  $\log EC_{50}$  oberhalb der 25. Perzentile aufwiesen („normal“; Schwelle bei  $\log EC_{50} = -6,76$  mol/L) und jenen, die eine  $\log EC_{50}$  unterhalb davon aufwiesen (Abbildung 9A). In desensibilisierten Trabekeln kam es zu einer stärkeren Abnahme der Kontraktilität als in den Trabekeln mit normaler  $\beta_1$ -AR Sensibilität für NA (Abbildung 9B). Insgesamt waren die Ausgangskraft und die maximal entwickelte Kraft (Effektivität) unter Noradrenalin nicht unterschiedlich in beiden Gruppen (nicht gezeigt bzw. Abbildung 5).



**Abbildung 9:** **A:** Noradrenalin  $-\log EC_{50}$  Werte von Trabekeln ober- ( $n=17$ ) und unterhalb der 25. Perzentile der Noradrenalin Sensibilität ( $n=49$ ; „cutoff“ bei  $\log EC_{50} = -6,76$  mol/L). **B:** Durchschnittliche Kraft (in % vom Maximum) in normal sensiblen und desensibilisierten Trabekeln (Desens.) nach Noradrenalin Zugabe in Abhängigkeit von der Zeit (Werte wie in Abbildung 6 ermittelt). \* $p < 0.05$  und \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.0001$  vs. Normal.

#### 4.2.2. Auswertung der Patienten-Charakteristika

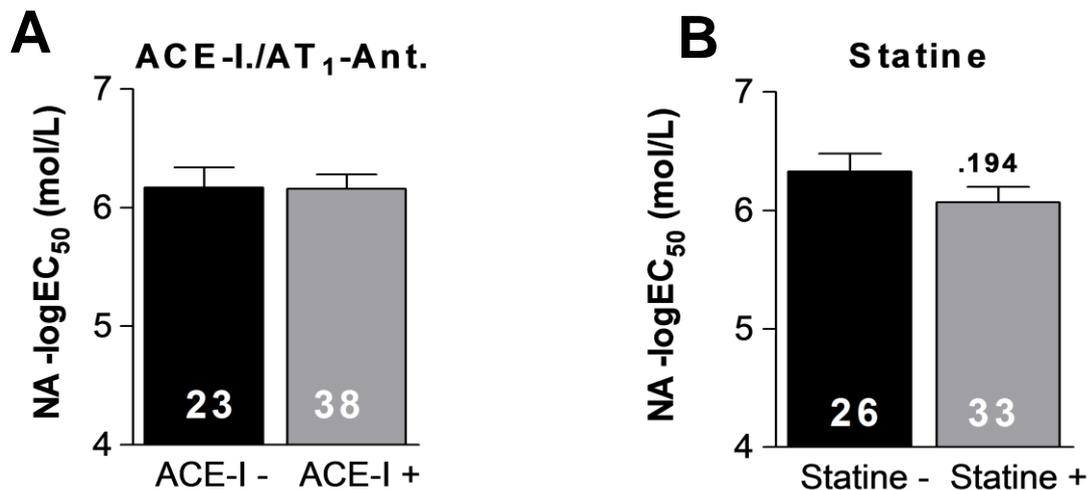
Um eine Erklärung für die Desensibilisierung der  $\beta_1$ -AR zu finden, wurden die Patienten-Charakteristika bezüglich Geschlecht, Alter, zugrunde liegender Erkrankung (koronare Herzkrankheit versus Herzklappen-Erkrankungen), Medikation und linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) näher analysiert. Weder die zugrunde liegende Erkrankung, Geschlecht noch die LVEF standen im Zusammenhang mit einer Desensibilisierung der  $\beta_1$ -AR anhand der Noradrenalin  $EC_{50}$  Werte (Abbildung 10A-C). Teilte man nun aber die Patienten nach dem medianen Alter von 67 Jahren in zwei Gruppen ein, so erkannte man für die älteren Patienten einen leichten Trend zu einer  $\beta_1$ -AR Desensibilisierung ( $p=0,18$ ; Abbildung 10D).



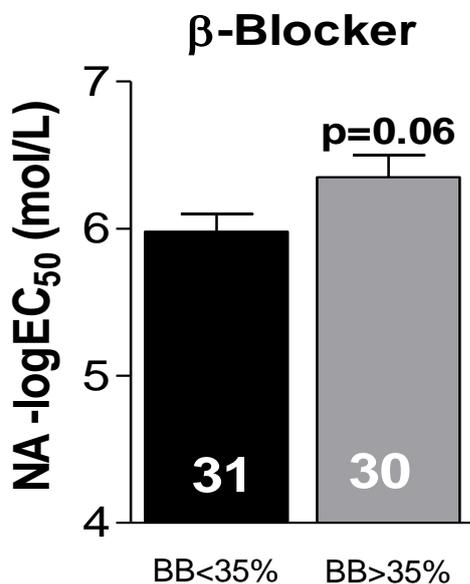
**Abbildung 10 A-D:** Noradrenalin  $EC_{50}$  Werte in Abhängigkeit von Art des operativen Eingriffs (A), Geschlecht (B), LV -Ejektionsfraktion (EF; C) und Alter (D). In C und D wurden die kontinuierlichen Variablen (LVEF und Alter) entlang des Medians in 2 Gruppen eingeteilt.

Die Einnahme eines ACE-Hemmers zeigte keine Korrelation mit der  $\beta_1$ -AR Sensibilität (Abb. 11A). Die Einnahme von Statinen zeigte hingegen einen

schwachen Trend zu einer geringeren  $\beta_1$ -AR Sensibilität (Abb. 11B), in prinzipieller Übereinstimmung mit Daten, die eine Desensibilisierung von  $\beta$ -AR durch verringerte Isoprenylierung und dadurch cytosolische Akkumulation der  $\gamma$ -Untereinheiten von  $G_s$  *in vitro* (Muhlhauser et al., 2006) und *in vivo* beobachteten (Schmechel et al., 2009). Die Einnahme eines  $\beta$ -Blockers zeigte hingegen einen klaren Trend für eine Sensibilisierung von  $\beta_1$ -AR. Wir teilten diese Patienten entlang des Medians der Dosierung des  $\beta$ -Blockers in solche mit einer Dosis  $<$  oder  $>$  35% (entsprechend der 1. Quartile) der empfohlenen maximalen Tagesdosis ein. Hier zeigte sich ein Trend zugunsten sensibilisierter Rezeptoren bei Patienten mit  $\beta$ -Blocker Dosis  $>$ 35% der empfohlenen Maximaldosis ( $r=0,27$ ,  $p=0,06$ ; Abbildung 12).

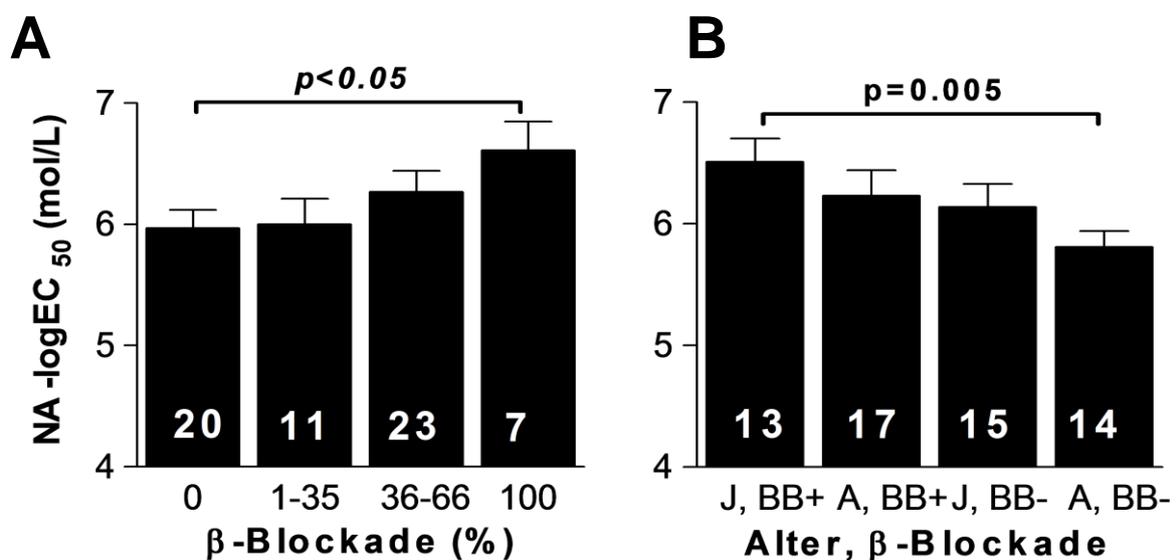


**Abbildung 11:** A: Die NA -logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der medikamentösen Therapie mit einem ACE-Inhibitor (ACE-I) bzw. AT1-Antagonisten (AT1-Ant.) B: NA -logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der medikamentösen Therapie mit einem Statin.



**Abbildung 12:** NA-logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der medikamentösen Therapie mit einem  $\beta$ -Blocker.

Nach Unterteilung der Gruppen in Quartile der entsprechenden empfohlenen Tagesdosis (0%, 1-35%, 36-66%, 67-100%) zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Sensibilität des  $\beta_1$ -AR: Je höher die prozentuale Dosis des eingenommenen  $\beta$ -Blockers war, desto höher war die Sensibilität am  $\beta_1$ -AR (Abbildung 13A). Die Kombination aus Alter und  $\beta$ -Blocker Behandlung (jeweils entlang des Medians) zeigte ebenfalls einen deutlichen Zusammenhang zur  $\beta_1$ -AR Sensibilität: junge Patienten (<67 J.) mit  $\beta$ -Blocker (>35% der empfohlenen Tagesdosis) hatten eine deutlich erhöhte Sensibilität gegenüber alten Patienten ohne  $\beta$ -Blocker Therapie (Abbildung 13B).

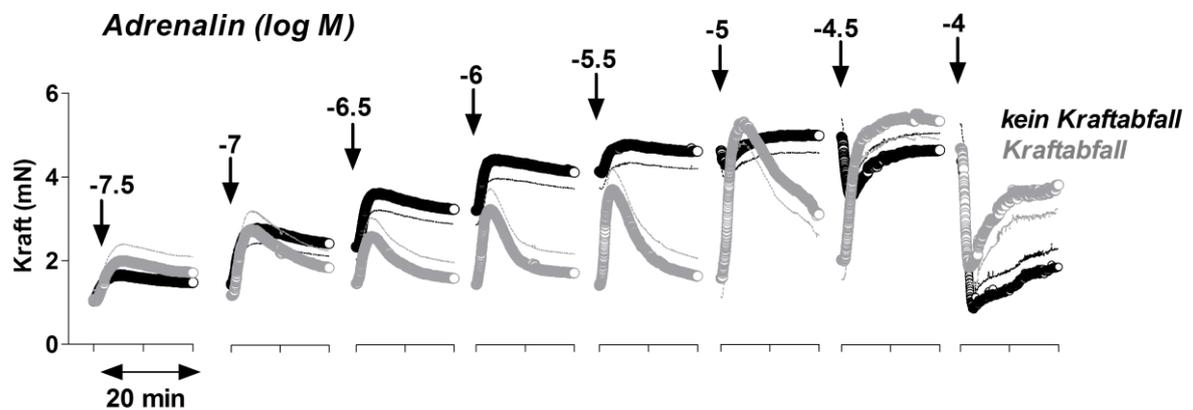


**Abbildung 13:** **A:** NA -logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der  $\beta$ -Blocker Dosis. **B:** NA -logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der Kombination aus  $\beta$ -Blocker Dosis (BB+=>35% der empfohlenen Tagesdosis) und Alter des Patienten (J=<67 J.).

#### 4.2.3. Effekte der $\beta_2$ -AR Stimulation

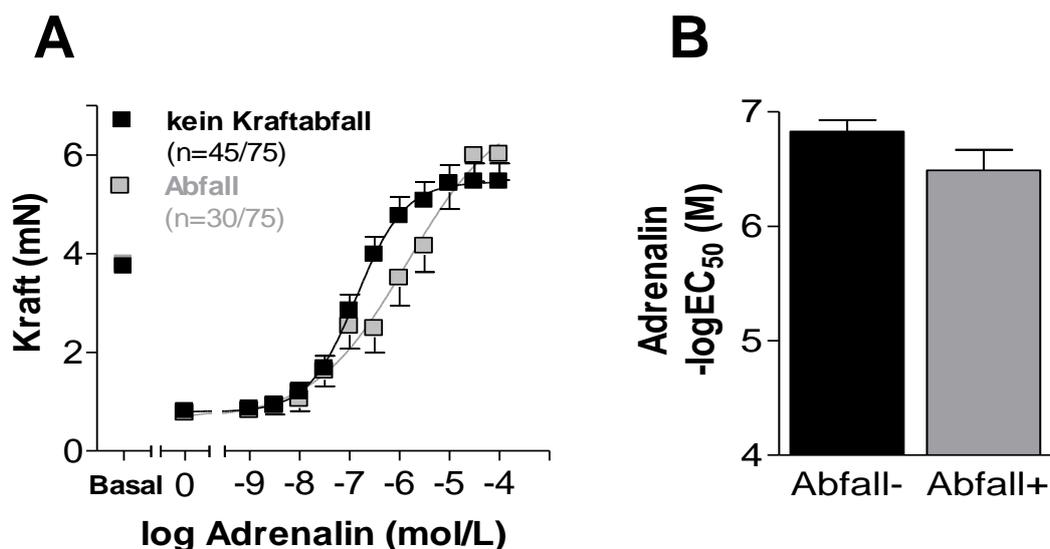
Die Ergebnisse am  $\beta_2$ -AR, den wir nach vorheriger Blockade des  $\beta_1$ -AR mit CGP-207.12A durch Stimulation mit Adrenalin untersuchten, waren ähnlich zu denen am  $\beta_1$ -AR (Abbildung 14; vgl. hierzu auch Abbildung 5). Hier untersuchten wir insgesamt Trabekel aus 75 Vorhöfen, von denen 30 (ca. 40%) ebenfalls einen Abfall der Kraft nach Erreichen des Maximums zeigten, während in der Mehrzahl der Gewebe die Kraft weitgehend konstant blieb. Bei sehr hohen Konzentrationen von Adrenalin kam es zu einer initialen Abnahme der Kraft, die sich dann innerhalb der nächsten Minuten wieder erholte (siehe schwarze Kurve bei log Adrenalin -4.5 M und graue Kurve bei log Adrenalin -4.0 M). Frühere Arbeiten zeigen, dass der initial negativ

inotrope Effekt auf eine  $\beta_2$ -AR-medierte, Adrenalin-spezifische Stimulation des inhibitorischen G-Proteins zurückzuführen ist (Heubach et al., 2004).



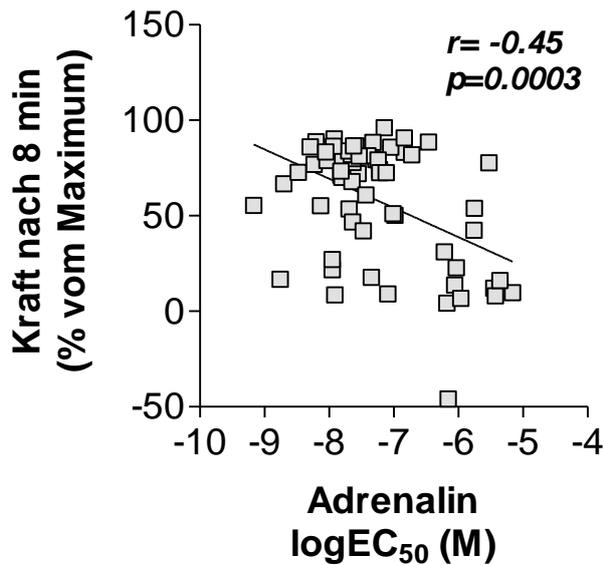
**Abbildung 14:** Verlauf der absoluten Kraftzunahme in mN bei kumulativen Adrenalin-Konzentrationen über einen Zeitraum von jeweils 20 min pro Konzentration. Dargestellt ist eine Gruppe von Trabekeln, die nach dem initial positiv inotropen Effekt eine sekundäre Abnahme desselben zeigten („Kraftabfall“; n=30). Im Gegensatz dazu blieb in der anderen Gruppe (n=45) die Kontraktilität nach Erreichen des Maximums weitgehend konstant (kein Kraftabfall; n=45). Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Adrenalin Applikationen, deren Konzentrationen (in log M) als Zahlen darüber angezeigt sind. Es sind von allen Experimente die ersten 20 min des Kraftverlaufs vereinheitlicht dargestellt und gemittelt.

Im Gegensatz zu  $\beta_1$ -AR war der sekundäre Kraftabfall bei geringeren Adrenalin Konzentrationen nicht mit einer verminderten Sensibilität des  $\beta_2$ -AR assoziiert (Abbildung 15A und B; vgl. hierzu Abbildung 7A und B).



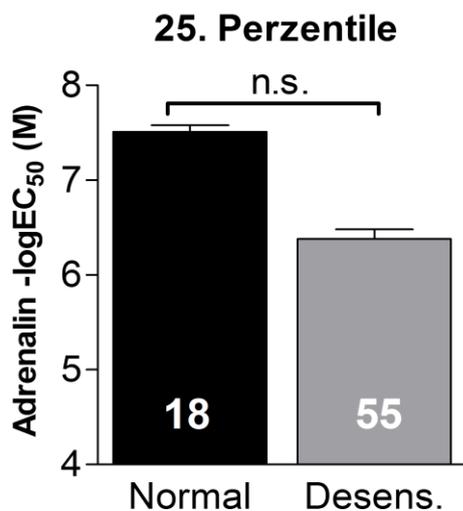
**Abbildung 15: A:** Konzentrations-abhängiger Effekt von Adrenalin in der Gegenwart von CGP 207.12A ( $\beta_2$ -AR Stimulation) auf die Kontraktionskraft (maximaler inotroper Effekt jeder Konzentration) in Trabekeln mit und ohne sekundären Kraftabfall. **B,**  $-\log EC_{50}$  für Adrenalin in der Gegenwart von CGP 207.12A ( $\beta_2$ -AR Effekt) in Trabekeln mit (Abfall+) und ohne sekundäre Abnahme der Kontraktilität (Abfall-). p= n.s.

Es zeigte sich auch eine schwächere Korrelation zwischen dem Abfall der Kraft nach 8 min und der Adrenalin Potenz am  $\beta_2$ -AR im Vergleich zu den Daten am  $\beta_1$ -AR (Abbildung 16; vgl. Abbildung 8). Nach Einteilung der Gewebe entlang des Medians in Gewebe mit normal sensiblen und desensibilisierte  $\beta_2$ -AR ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Kraftverlaufs nach Erreichen des jeweiligen Maximums nach Zugabe des Agonisten (Abbildung 17).

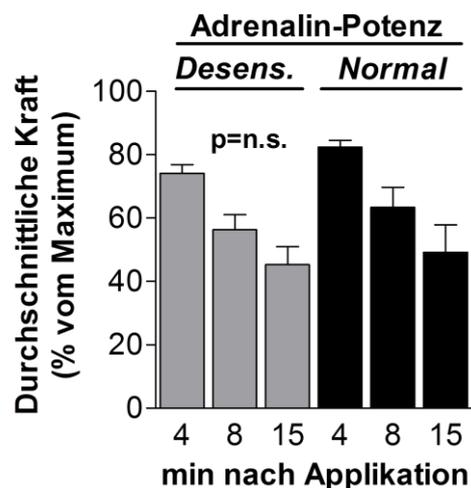


**Abbildung 16:** Korrelation zwischen dem Abfall der Kraft nach 8 Minuten und der Adrenalin Potenz am  $\beta_2$ -AR

**A**



**B**



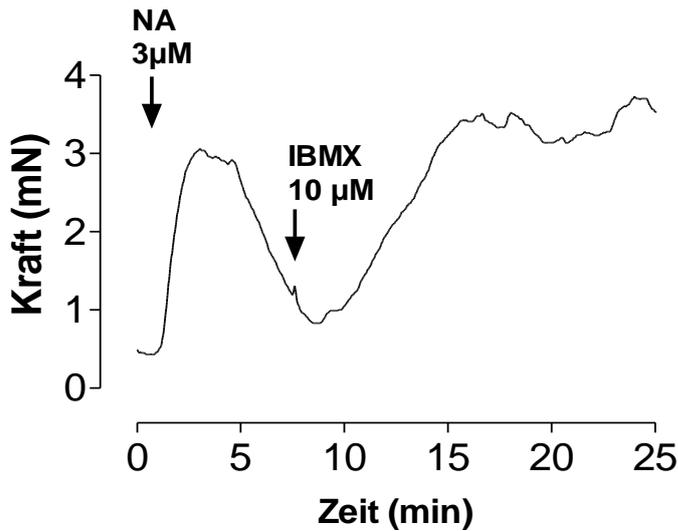
**Abbildung 17: A:** Adrenalin  $-\log EC_{50}$  in „normalen“ ( $n=18$ ) und desensibilisierten Trabekeln ( $n=55$ ; Schwelle an der 25. Perzentile, entsprechend einer  $-\log EC_{50}$  von 7.19 mol/L). **B:** Zeitabhängiger Verlauf der Kontraktionskraft nach Stimulation in normalen und desensibilisierten Trabekeln nach  $\beta_2$ -AR Stimulation mit Adrenalin in der Gegenwart von CGP-207.12A.

Einzig das Alter der Patienten zeigte eine schwache, aber signifikante Korrelation in Bezug auf die Adrenalin Potenz am  $\beta_2$ -AR ( $r=0,18$ ,  $p<0,05$ ; nicht gezeigt). Alle anderen Faktoren wie Geschlecht, Alter, zugrunde liegende Erkrankung und Medikation schienen keinerlei Einfluss auf die  $\beta_2$ -AR Sensibilität zu haben. Insbesondere die Dosierung der  $\beta$ -Blocker Therapie hatte, im Gegensatz zum  $\beta_1$ -AR, keinen Effekt auf die Sensibilität des  $\beta_2$ -AR (Abbildung nicht gezeigt).

#### **4.3. Abnahme der Kontraktionskraft nach Erreichen des Maximums ist auf Phosphodiesterasen zurückzuführen**

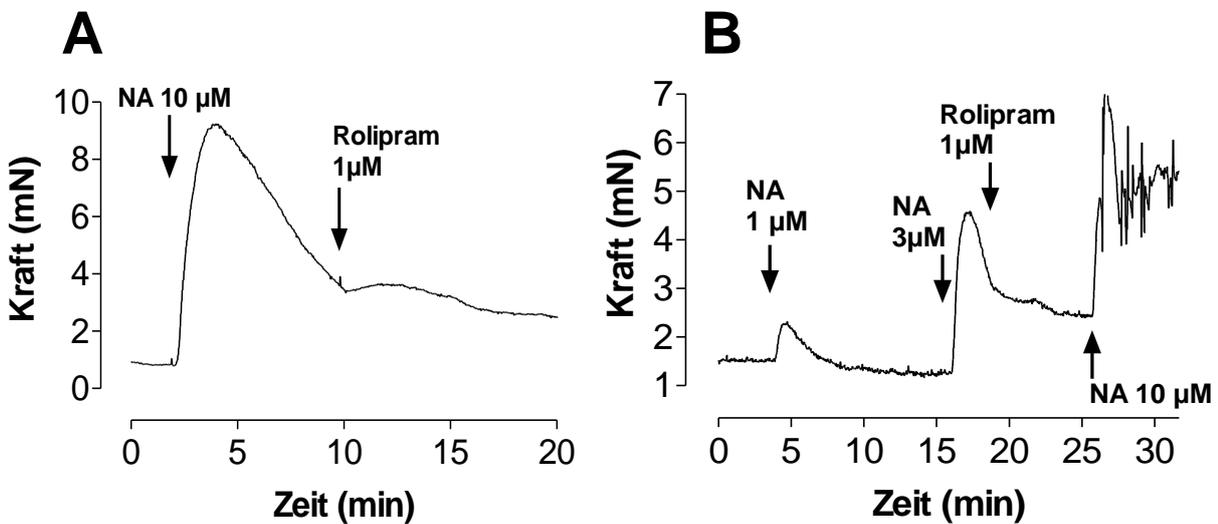
Es ist bekannt, dass der Anstieg der Kontraktionskraft nach  $\beta$ -AR Stimulation durch den intrazellulären Botenstoff cAMP mediert wird. Dieser aktiviert die PKA, welche über eine Phosphorylierung von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen, Phospholamban – einem Inhibitor der SR  $Ca^{2+}$  ATPase – und des Ryanodin Rezeptors zu einer Zunahme der Amplitude cytosolischer  $Ca^{2+}$ -Transienten führt, was letztlich die Zunahme der Kontraktionskraftamplitude und -geschwindigkeit bedingt. Dieses cAMP wird zeitlich und räumlich durch verschiedene PDE in sogenannten Mikrodomänen kontrolliert, die die Ausbreitung von cAMP auf Regionen mit diesen Zielproteinen beschränkt (z.B. subsarkolemmal oder in der Nähe des SR). In Herzmuskelzellen spielen insbesondere die PDE3 und PDE4 eine besondere Rolle. In verschiedenen Zellsystemen wurden bereits transiente Anstiege von cAMP trotz fortgesetzter Agonisten-Stimulation beobachtet, u. a. auch in neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten (Nikolaev et al., 2006; Zaccolo and Pozzan, 2002). Wir spekulierten daher, dass die Abnahme der Kraft in desensibilisierten Geweben auf den Abbau von cAMP durch PDE zurückzuführen ist.

Um dies zu testen, führten wir Experimente in der Abwesenheit und Gegenwart verschiedener PDE-Inhibitoren durch. Durch akute Zugabe des nicht-selektiven PDE-Inhibitors IBMX zu einem Trabekel, bei dem nach Zugabe von 3  $\mu\text{mol/L}$  Noradrenalin die Kontraktionskraft nach dem Maximum schnell wieder abnahm, kam es zu einer Rekonstitution der Kraftentwicklung ohne erneute Zugabe des Agonisten nach ca. 5-7 Minuten (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Original-Daten: Zeitabhängiger Verlauf der Kraftentwicklung nach Hinzugabe von Noradrenalin (3µM) in der Gegenwart von ICI118.551 mit anschließender Zugabe des unselektiven PDE-Hemmers IBMX (10µM).

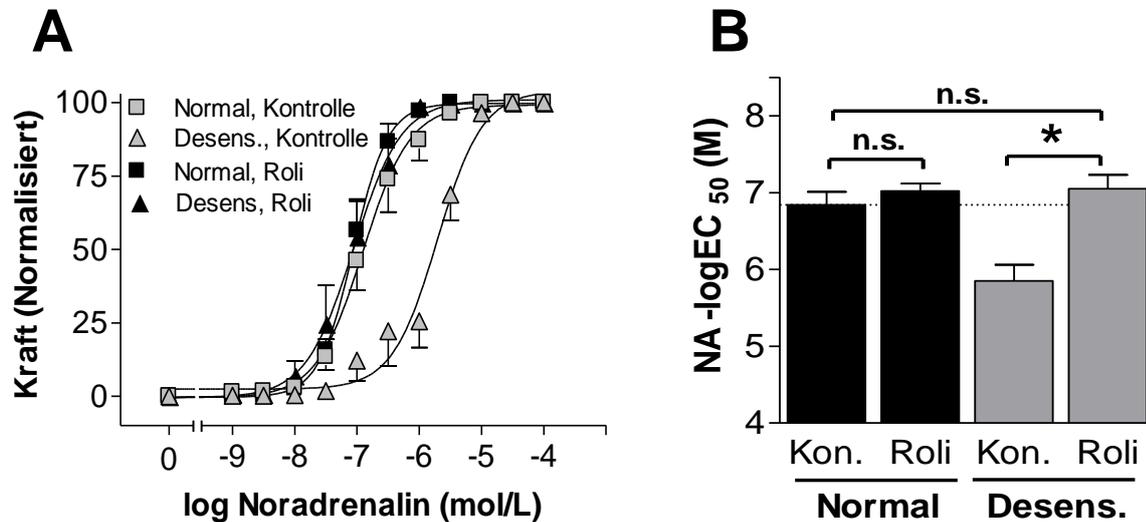
Ähnliche Effekte wurden auch mit Milrinon, einem selektiven Inhibitor der PDE3 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Durch akute Zugabe des PDE4-Inhibitors Rolipram wurde zwar der Abfall der Kraft abrupt gestoppt, jedoch kam es nicht zu einer Erholung des Kraftniveaus wie unter der Zugabe von IBMX oder Milrinon (Abbildung 19A).



**Abbildung 19:** Original-Daten: **A:** Zeitabhängige Kraftentwicklung nach Zugabe von 10µM NA mit anschließender Gabe von 1µM Rolipram. **B:** Kraftentwicklung nach kumulativer NA Gabe (1 und 3 µM) mit anschließender Zugabe von Rolipram (1µM) und anschließend nochmaliger Gabe von 10µM NA. Hierunter Auftreten einer Arrhythmie.

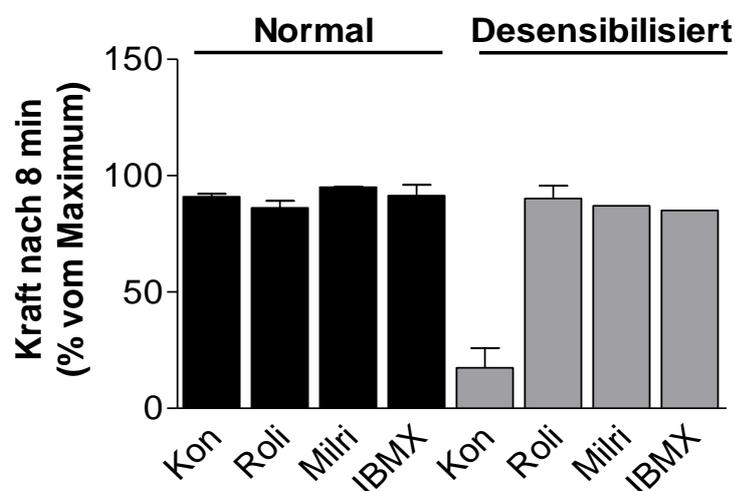
Nach Zugabe der nächst höheren Noradrenalkonzentration in der fortgesetzten Gegenwart von Rolipram nahm die Kraft nun nicht mehr ab, es traten allerdings gehäuft Arrhythmien auf (Abbildung 19B). Wenn man Trabekel vor Zugabe des Agonisten mit Rolipram inkubierte, konnte am  $\beta_1$ -AR die Abnahme der Kraft nach  $\beta$ -

adrenerger Stimulation vollständig verhindert werden. Dies war mit einer vollständigen Rekonstitution der Sensibilität der  $\beta_1$ -AR auf das Niveau der nicht desensibilisierten Gewebe assoziiert (Abbildung 20A und B).



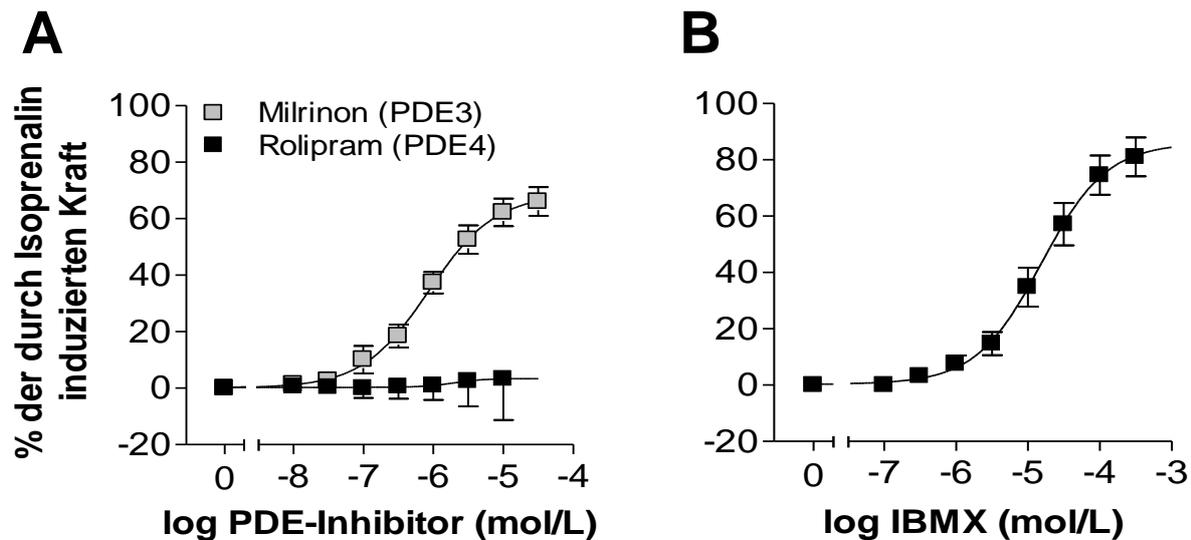
**Abbildung 20:** **A:** Konzentrations-abhängiger Effekt von Noradrenalin in der Abwesenheit und Gegenwart des PDE4 Inhibitors Rolipram (Roli; 100 nM) in desensibilisierten Trabekeln mit biphasischem Kontraktionskraftverlauf (Desens; n=7) und solchen mit normaler Sensibilität gegenüber Noradrenalin und monophasischem Kontraktionskraftverlauf (Kontrolle; n=9). **B:** -logEC<sub>50</sub> Werte für Noradrenalin in der Gegenwart von ICI 118.551 ( $\beta_1$ -AR Effekt) für dieselben Gruppen wie in **A**.

Im Gegensatz hierzu hatte Rolipram in den Geweben, die unter Kontrollbedingungen eine normale Sensibilität des  $\beta_1$ -AR zeigten, keinerlei Effekt auf die zeitabhängige Kraftentwicklung oder logEC<sub>50</sub> (Abbildung 20A, B; Abbildung 21).



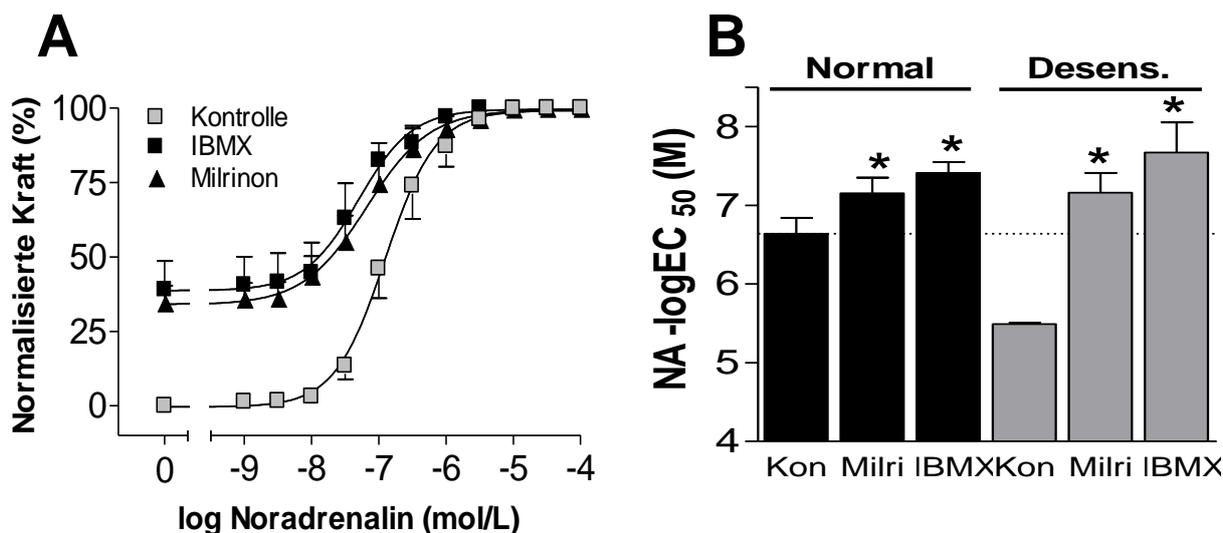
**Abbildung 21:** Noradrenalin-induzierte Kraftentwicklung in % des Maximums 8 Minuten nach Applikation des Agonisten in Trabekeln mit normaler Sensibilität gegenüber Noradrenalin (Normal) und solchen mit Desensibilisierung gegenüber Noradrenalin in der Abwesenheit (Kon; Normal: n=33; Desensibilisiert: n=33) und Gegenwart von Inhibitoren der PDE4 (Roli; n=9/7) PDE3 (Milri; n=1/1) und des nicht-selektiven PDE-Inhibitors IBMX (n=4/1).

In Abwesenheit eines jeglichen Agonisten führte Rolipram alleine jedoch zu keinem positiv oder negativ inotropen Effekt, während die Inhibition der PDE3 durch Milrinon die basale Kraft auf  $66\pm 5\%$  der maximal durch Isoprenalin induzierbaren Kraft erhöhte (Abbildung 22A). Inhibierte man nicht selektiv alle PDE mit IBMX, resultierte hieraus eine Kraftsteigerung auf  $81\pm 7\%$  der maximal durch Isoprenalin induzierbaren Kraft (Abbildung 22B).



**Abbildung 22:** **A:** Kraftentwicklung unter Hinzugabe kumulativer Konzentrationen der PDE-Inhibitoren Milrinon (n=6) oder Rolipram (n=8). **B:** Kraftentwicklung unter Hinzugabe kumulativer Konzentrationen des unselektiven PDE-Hemmers IBMX (n=7). Alle Experimente in der Abwesenheit eines  $\beta$ -AR Agonisten.

Präinkubierte man die Trabekel mit entweder Milrinone oder IBMX, kam es – in Übereinstimmung mit den Daten in Abbildung 22 – bereits vor der Zugabe des Agonisten Noradrenalin zu einer Steigerung der basalen Kraft. Die Sensibilität der  $\beta_1$ -AR wurde hierdurch auf Werte, die noch über denen der Kontrollgruppe lagen, erhöht. Dies galt am  $\beta_1$ -AR für sowohl die normal affinen als auch für die desensibilisierten Trabekel (Abbildung 23A und B).

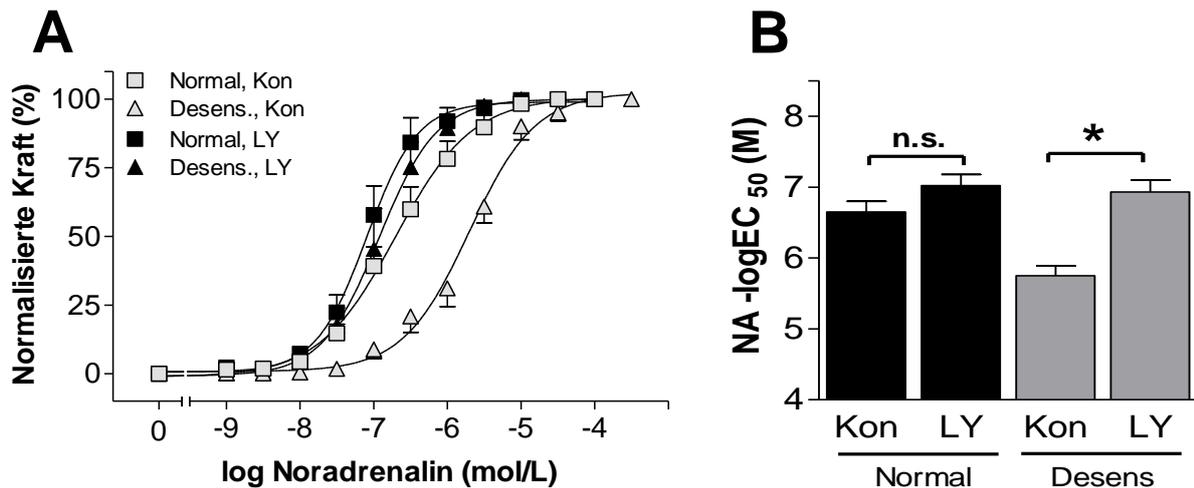


**Abbildung 23:** **A:** Konzentrations-abhängige Kontraktionskraftentwicklung in % des Maximaleffektes in der Abwesenheit (Kontrolle; n=33) und Gegenwart des PDE3-Inhibitors Milrinon (n=6) oder des nicht-selektiven PDE-Inhibitors IBMX (n=2) in Trabekeln mit normaler  $\beta_1$ -AR Affinität für Noradrenalin in der jeweiligen Kontrollgruppe. **B,** Noradrenalin (NA)  $-\log EC_{50}$  Werte für Trabekel mit normaler (Normal) oder reduzierter  $\beta_1$ -AR Sensibilität (Desens.) in der Abwesenheit (Normal: n=33; Desens.: n=33) oder Gegenwart von Milrinon (Milri; n=6/2) bzw. IBMX (n=2/7). \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle (Kon) im gepaarten t-Test in Bezug auf die jeweilige Kontroll-Bedingung. Hinweis: da es sich um 2 verschiedene Kontroll-Gruppen (für IBMX bzw. Milrinon) handelt, sind hier aus didaktischen Gründen die Werte der Kontrollbedingung von allen Experimenten der Kontrollgruppe (n=33/33) aufgeführt.

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse in Bezug auf die PDE, dass in Abwesenheit eines Agonisten die PDE3, nicht aber die PDE4, konstitutiv aktiv ist, wohingegen durch die Stimulation des  $\beta_1$ -AR in einem Teil der Gewebe die PDE4 aktiviert wird, welche dann die Kraftentwicklung zeitlich limitieren kann. Dies führt darüber hinaus zu einer Desensibilisierung des  $\beta_1$ -AR.

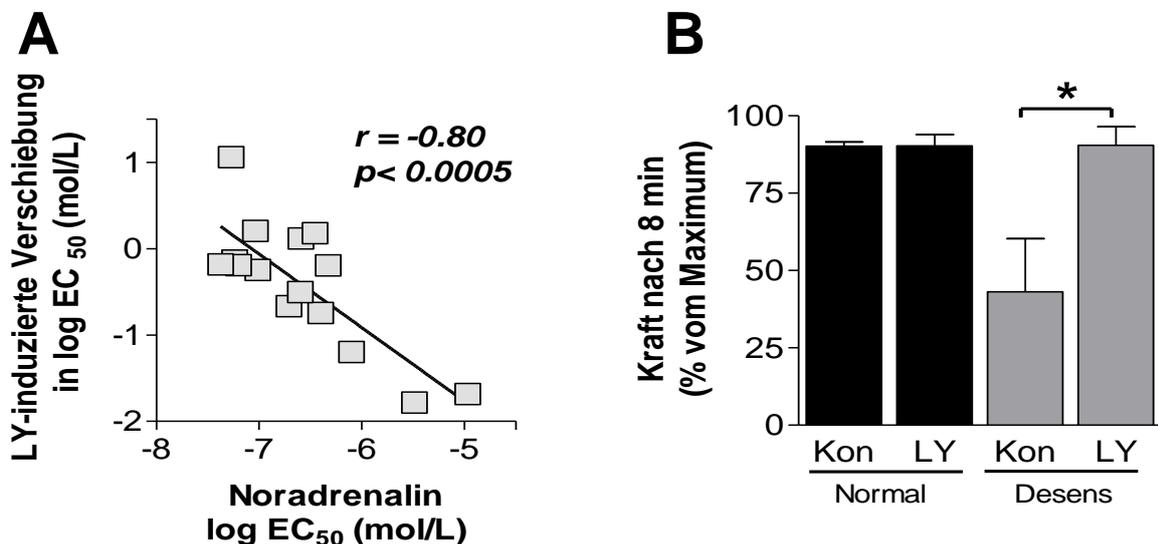
#### 4.4. Die Rolle der PI3-Kinase

Es ist bekannt, dass der klassische Aktivierungsweg der PDE4 ein negativer Feedback Mechanismus über die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A ist (Sette and Conti, 1996). Neuere Daten zeigen jedoch, dass die PDE4 in Mäusen auch durch die PI3-Kinase aktiviert werden kann (Crackower et al., 2002; Kerfant et al., 2007). Die PI3-Kinase wiederum wird über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation aktiviert. Daher untersuchten wir nun, ob die PI3-Kinase eine Rolle bei der Desensibilisierung der  $\beta$ -AR am menschlichen Myokard spielt. Dafür wurden die Trabekel mit LY294002 (LY) vorinkubiert, einem Hemmer der PI3-Kinase. Dieser hatte Effekte vergleichbar mit Rolipram: LY294002 hatte keinen eigenen positiv inotropen Effekt (Abbildung nicht gezeigt), es resensibilisierte desensibilisierte  $\beta_1$ -AR und hatte in Gewebe mit normal sensiblen  $\beta$ -ARs keinen Effekt (Abbildung 24A und B).



**Abbildung 24:** **A:** Konzentrations-abhängiger Effekt von Noradrenalin in der Abwesenheit und Gegenwart des PI3K Inhibitors LY294002 (LY; 5  $\mu$ M) in desensibilisierten Trabekeln mit biphasischem Kontraktionskraftverlauf (Desens; n=7) und solchen mit normaler Sensibilität gegenüber Noradrenalin und monophasischem Kontraktionskraftverlauf (Kontrolle; n=8). **B:** -logEC<sub>50</sub> Werte für Noradrenalin in der Gegenwart von ICI 118.551 ( $\beta_1$ -AR Effekt) für dieselben Gruppen wie in **A**.

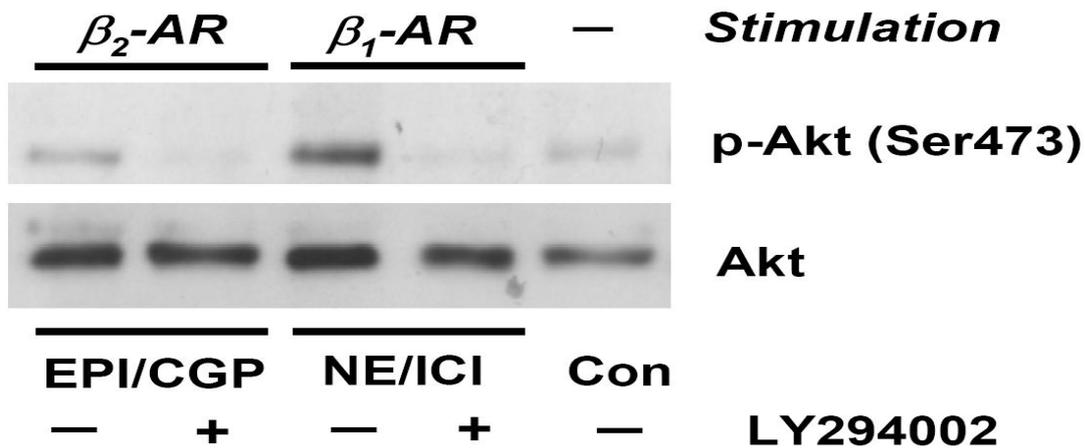
Je stärker der  $\beta_1$ -AR desensibilisiert war, desto stärker konnte LY diesen wieder resensibilisieren (Abbildung 25A). Außerdem war auch unter LY, wie bei Rolipram, der sekundär auftretende Kraftabfall nicht mehr vorhanden (Abbildung 25B). Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit Wortmannin, einem anderen, jedoch weniger selektiven PI3-Kinase Inhibitor, erhoben (nicht gezeigt).



**Abbildung 25:** **A:** LY-induzierte Verschiebung der logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der jeweiligen Noradrenalin logEC<sub>50</sub> (normal vs. desensibilisierte Trabekel). **B:** Kraftentwicklung nach 8 Minuten in Trabekeln mit und ohne Abfall der Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Inkubation mit LY, \*p<0.0005 vs. Kontrolle.

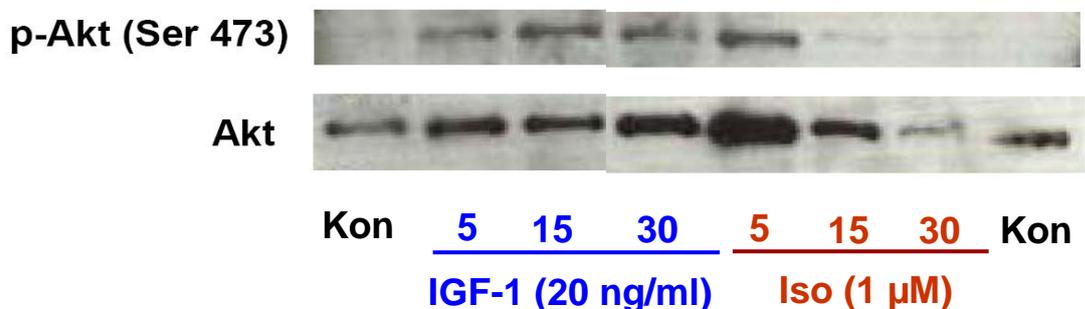
Um einen weiteren Nachweis einer PI3-Kinase Aktivierung in menschlichem Vorhofmyokard nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu erbringen, bestimmten wir die Phosphorylierung von Akt, einem bekannten „downstream target“ der PI3-Kinase.

Hierfür wurden Western-Blot Experimente an Trabekeln, die in den oben aufgeführten Experimenten verwendet wurden, durchgeführt. Es wurde sowohl die am Serinrest 473 phosphorylierte- als auch nicht-phosphorylierte Form der Akt detektiert. Sowohl die Stimulation von  $\beta_1$ - als auch  $\beta_2$ -AR führte zur Phosphorylierung von Akt an Ser473 (Abbildung 26). Diese konnte durch Vorinkubation mit LY aufgehoben werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Repräsentatives Western-Blot Experiment mit Antikörpern gegen  $\text{Ser}^{473}$ p-Akt (obere Reihe) bzw. Akt Gesamtprotein (untere Reihe) nach selektiver Stimulation des  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -AR in der Abwesenheit und Gegenwart von LY294002.

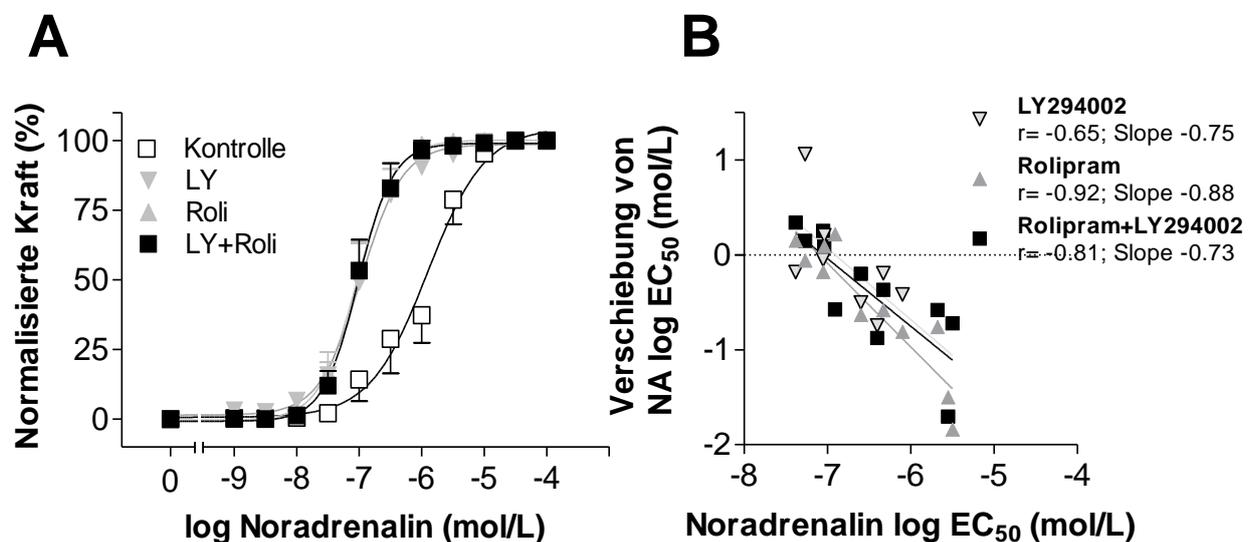
Diese Phosphorylierung erschien bereits 5 Minuten nach der Zugabe des Agonisten und war meist transient (Abbildung 27). Als Positivkontrolle inkubierten wir Trabekel in der Abwesenheit jeglicher  $\beta$ -AR Liganden mit Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), einem klassischen Aktivator der PI3-Kinase, der eine zumindest über 30 min anhaltende Phosphorylierung von Akt verursachte (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Western-Blot Experiment: Zeitabhängige  $\text{Ser}^{473}$ p-Akt und Akt Expression nach Hinzugabe von IGF-1 (20 ng/ml) oder Isoprenalin (Iso; 1  $\mu$ M) an humanen Vorhoftrabekeln, die bei 37°C und 1 Hz elektrisch stimuliert wurden. IGF-1 hatte keinen inotropen Effekt (nicht gezeigt).

#### 4.5. Sind PI3K und PDE4 Teile desselben Signaltransduktionsweges?

Da unter der Hemmung der PDE4 mit Rolipram und der PI3-Kinase mit LY294002 ähnliche Effekte in Bezug auf die Sensibilisierung kardialer  $\beta_1$ -AR zu beobachten waren, wurden Experimente mit kombinierter Applikation von Rolipram und LY294002 durchgeführt. Die kombinierte Gabe führte zu keiner additiven Sensibilisierung, d. h. keiner weiteren Linksverschiebung der Noradrenalin Konzentrations-Wirkungs Kurve am  $\beta_1$ -AR (Abbildung 28A und B). Dies deutet darauf hin, dass PI3-Kinase und PDE4 Teile desselben Signaltransduktionswegs sind, da andernfalls die Koinkubation zu einem additiven Effekt hätte führen müssen.

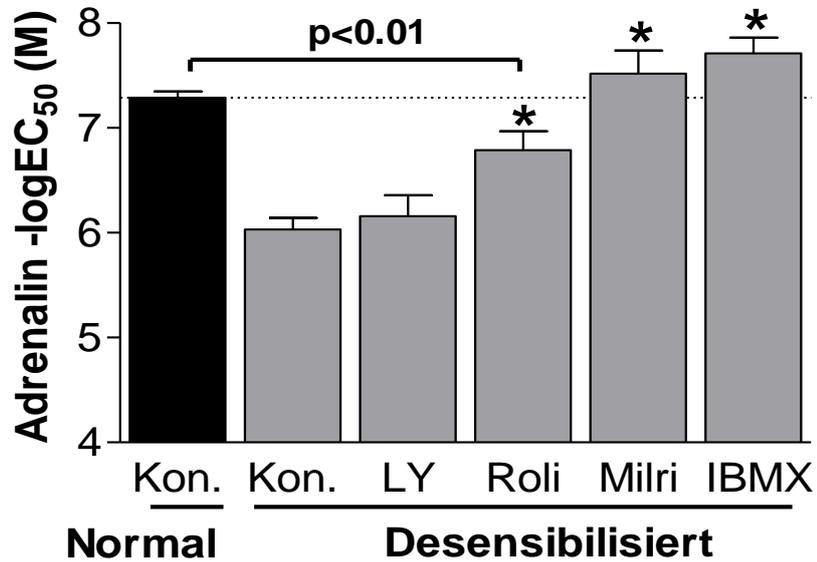


**Abbildung 28: A:** Konzentrations-abhängiger Effekt von Noradrenalin in der Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart des PI3K Inhibitors LY294002 (LY; 5  $\mu$ M; n=7), des PDE4-Inhibitors Rolipram (Roli; 100 nM; n=7) sowie der kombinierten Applikation von LY und Roli (n=5) in desensibilisierten Trabekeln mit biphasischem Kontraktionskraftverlauf. **B:** Verschiebung der NA logEC<sub>50</sub> in Abhängigkeit der Inkubation mit LY (n=11), Rolipram (n=8) und deren Kombination (n=11) in normal sensitiven und desensibilisierten Geweben.

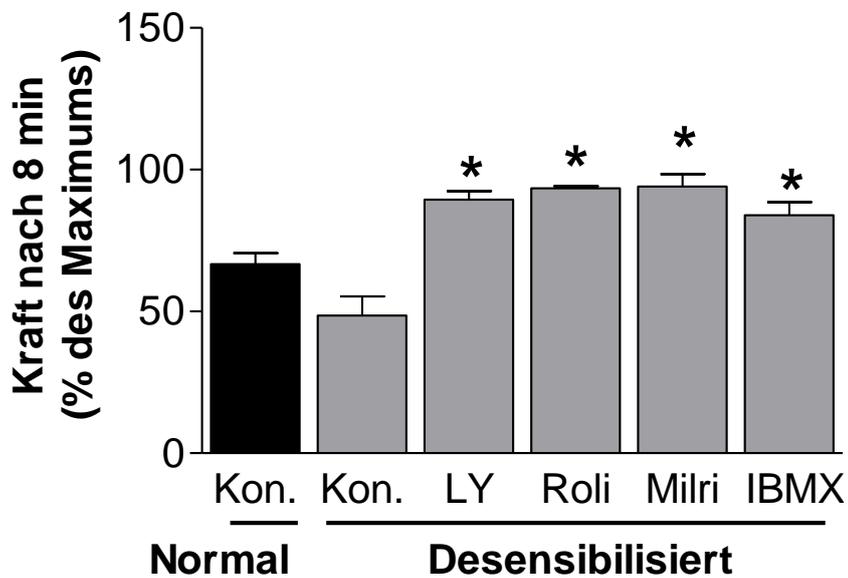
Um herauszufinden, ob PDEs und die PI3K auch die Sensibilität von  $\beta_2$ -AR sowie die Kraftabnahme nach Erreichen des Maximums kontrollieren, führten wir dieselben Experimente unter Zugabe von Adrenalin durch, nachdem wir den  $\beta_1$ -AR mit CGP207.12A geblockt hatten. Im Gegensatz zum  $\beta_1$ -AR war jedoch zu beobachten, dass  $\beta_2$ -AR nicht durch LY und auch nur teilweise durch Rolipram resensibilisiert wurden (Abbildung 29A). Der Abfall der Kraft im Verlauf jedoch wurde auch hier durch beide Substanzen verhindert (Abbildung 29B). Die nichtselektive Hemmung der PDEs durch IBMX oder auch die Hemmung der PDE3 durch Milrinon konnten

den Abfall der Kraft ebenfalls verhindern und führten auch zu einer Resensibilisierung der  $\beta_2$ -AR (Abbildung 29A und B).

**A**



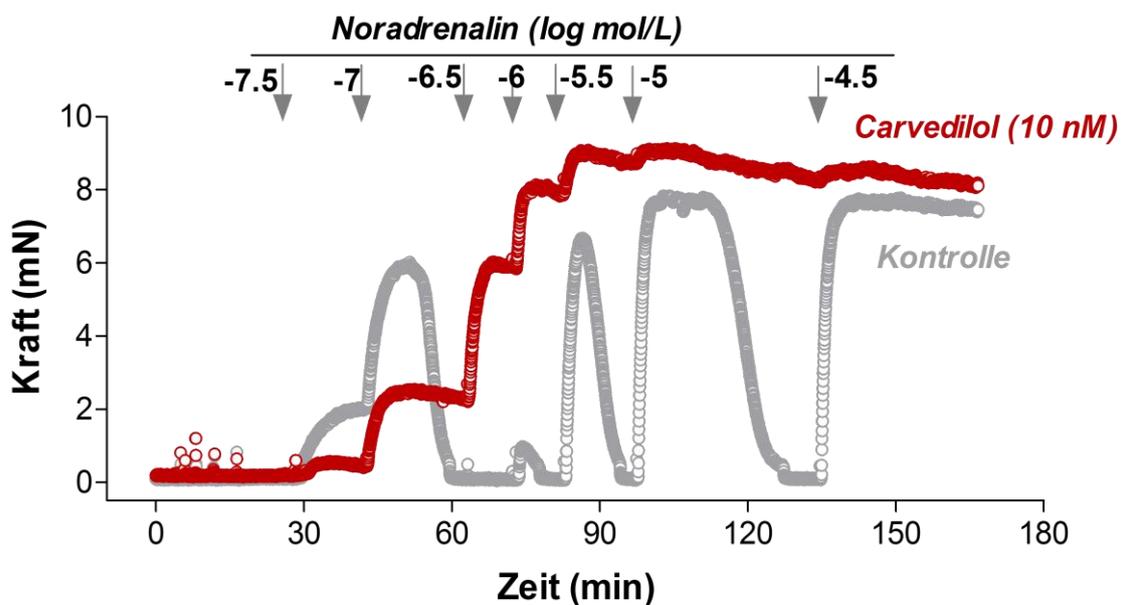
**B**



**Abbildung 29:** **A:** Adrenalin  $\log EC_{50}$  in den verschiedenen Gruppen (normal vs. desensibilisiert) in Abhängigkeit der Inkubation mit LY und den verschiedenen PDE-Inhibitoren. **B:** Kraftentwicklung nach 8 Minuten in den verschiedenen Gruppen (normal vs. desensibilisiert) in Abhängigkeit der Inkubation mit LY und den verschiedenen PDE-Inhibitoren, \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle (Kon).

#### 4.6. Der Einfluss von Carvedilol und Metoprolol auf die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft sowie die Sensibilität kardialer $\beta$ -AR

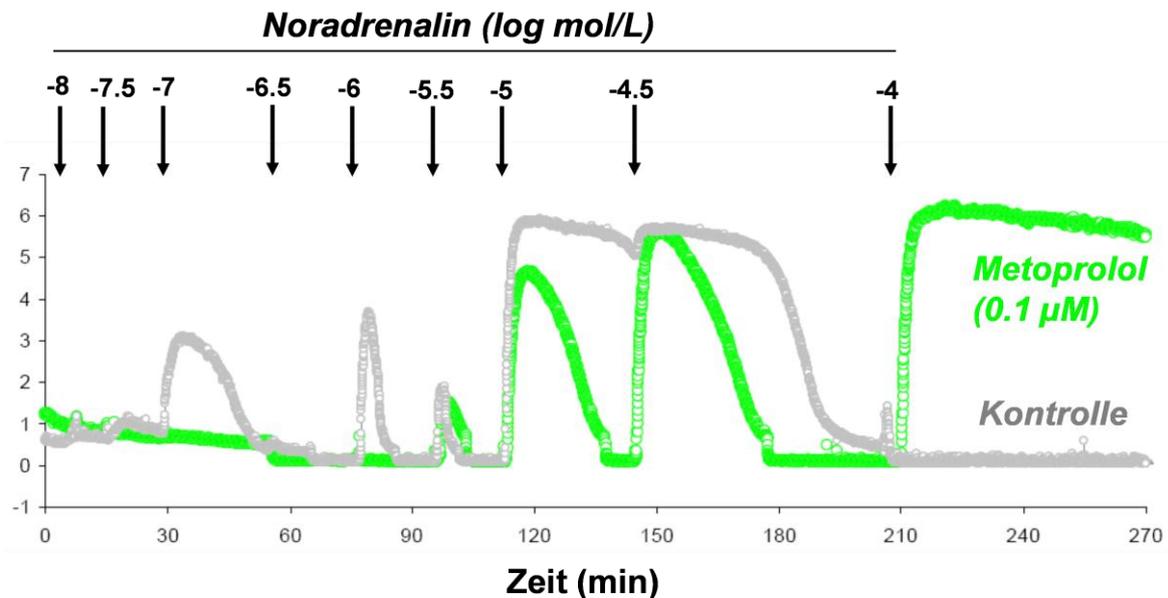
In dem initialen Experiment (Abbildung 4) wurde beobachtet, dass Carvedilol desensibilisierte  $\beta$ -AR wieder resensibilisieren konnte. Daher wurden nun Experimente mit Noradrenalin und Adrenalin in der Abwesenheit und Gegenwart von Metoprolol und Carvedilol durchgeführt. Wir setzten beide  $\beta$ -Blocker in äquipotenten Konzentrationen ein (10 nmol/L Carvedilol und 1  $\mu$ mol/L Metoprolol). Dementsprechend führten Metoprolol und Carvedilol sowohl in Geweben mit und ohne sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft zu einer vergleichbaren Rechtsverschiebung der  $\log EC_{50}$  Werte (Abb. 32A und C). Interessanterweise wurde durch Carvedilol, aber nicht durch Metoprolol, die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft komplett verhindert (Abb. 30, 31 und 32).



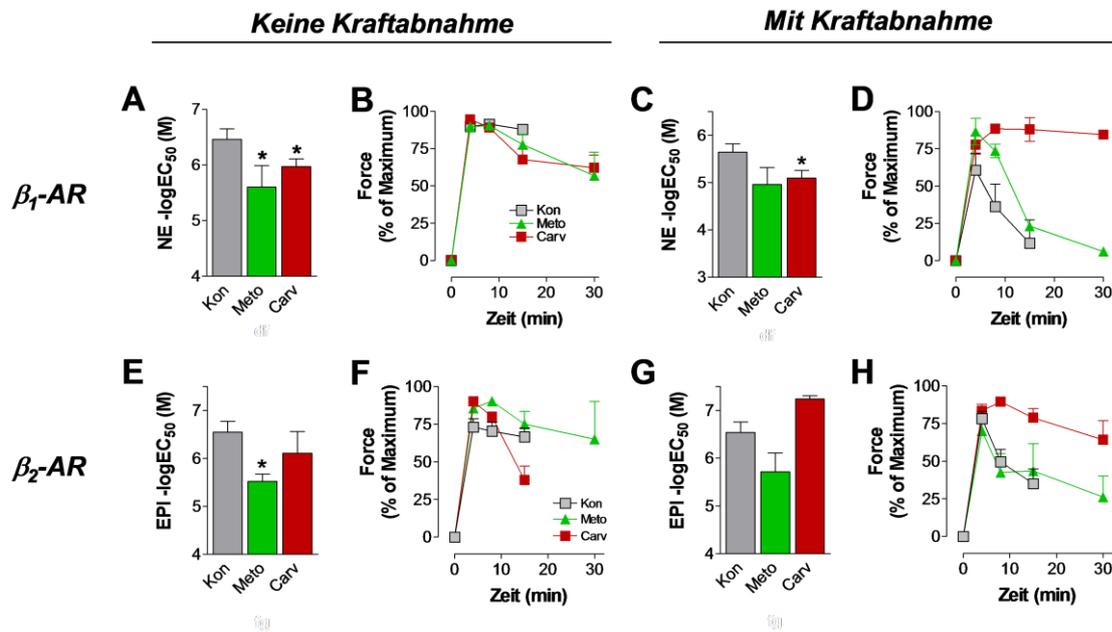
**Abbildung 30:** Originalregistrierung eines Experimentes, bei dem der Effekt kumulativer Konzentrationen von Noradrenalin in der Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von Carvedilol (10 nM) auf die Kontraktionskraft zu verfolgen ist. Der sekundäre Kraftabfall wird durch die Vorinkubation mit Carvedilol aufgehalten.

Ähnliche Beobachtungen wurden in Experimenten nach Adrenalin-Stimulation von  $\beta_2$ -AR gemacht, in denen Carvedilol, aber nicht Metoprolol, den Abfall der Kraft nach Adrenalin Stimulation verhindern konnte (Abbildung 32H). Die Effekte von Carvedilol waren hierbei, abgesehen von der leichten Rechtsverschiebung der  $EC_{50}$  Werte

vergleichbar mit denen einer PDE4- oder PI3K-Inhibition. Diese Daten deuten darauf hin, dass neben seinen Eigenschaften, nach längerer Inkubationszeit  $\beta$ -AR zu blockieren, Carvedilol – aber nicht Metoprolol – die Eigenschaft besitzt, einen Signalweg, der die sequentielle Aktivierung von PI3K und PDE4 beinhaltet, zu inhibieren. Dies trifft sowohl für  $\beta_1$ -AR als auch  $\beta_2$ -AR zu.



**Abbildung 31:** Originalregistrierung eines Experimentes, bei dem der Effekt kumulativer Konzentrationen von Noradrenalin in der Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von Metoprolol (0.1  $\mu$ mol/L) auf die Kontraktionskraft zu verfolgen ist. Metoprolol kann den sekundären Kraftabfall nicht aufhalten im Gegensatz zu Carvedilol (hierzu vgl. Abbildung 30)



**Abbildung 32:** Kumulative Ergebnisse der Experimente, bei denen kumulative Konzentrationen von Noradrenalin (+ICI118.551) zur selektiven  $\beta_1$ -AR Stimulation (A-D) bzw. Adrenalin (+CGP207.12A) zur selektiven  $\beta_2$ -AR Stimulation (E-H) in der Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von Carvedilol (Carv; 10 nmol/L) oder Metoprolol (Meto; 100 nmol/L) appliziert wurden. Die Ergebnisse sind unterteilt in die Vorhöfe, in denen monophasische Kontraktionskraftverläufe (A, B, E, F; linke Hälfte) oder biphasische Kontraktionskraftverläufe mit sekundärer Abnahme der Kontraktilität unter Kontrollbedingungen beobachtet wurden (C, D, G, H; rechte Hälfte). A, C, E und F:  $\log\text{EC}_{50}$  Werte für Noradrenalin in der Abwesenheit und Gegenwart der  $\beta$ -Blocker. B, D, F und H: Zeitliche Verläufe der Kontraktionskraft in den entsprechenden Gruppen. Dargestellt sind die gemittelten Verläufe der Konzentrationen 0.1 – 3  $\mu\text{mol/L}$  Noradrenalin, wie in Abbildung 6 dargestellt.  **$\beta_1$ -AR, keine Kraftabnahme:** Kontrolle, n=28; Carvedilol, n=4; Metoprolol, n=6; **mit Kraftabnahme:** Kontrolle, n=28, Carvedilol, n=5; Metoprolol, n=3;  **$\beta_2$ -AR, keine Kraftabnahme:** Kontrolle, n=11; Carvedilol, n=2; Metoprolol, n=6; **mit Kraftabnahme:** Kontrolle, n=15, Carvedilol, n=6; Metoprolol, n=4. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

## 5. Diskussion

### 5.1. $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion

Die wichtigsten Beobachtungen der vorliegenden der Arbeit sind:

- 1.) In menschlichem Vorhofmyokard unterliegen kardiale  $\beta_1$ -AR einer Desensibilisierung, der eine Aktivierung der PI3-Kinase und der PDE4 zugrunde liegt.
- 2.) Carvedilol, aber nicht Metoprolol, inhibiert diesen PI3-Kinase/PDE4-abhängigen Signalweg und sensibilisiert hierdurch kardiale  $\beta_1$ -AR.
- 3.) Carvedilol, aber nicht Metoprolol, weist eine langsame Assoziationskinetik auf und blockiert kardiale  $\beta_1$ -AR erst nach etwa 90 min.

Die klinische Ausgangsbeobachtung unserer Arbeit ist, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine Herabregulation und Desensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR auftritt (Bristow et al., 1982a), und dass die Behandlung dieser Patienten mit  $\beta$ -Blockern prinzipiell eine Resensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR bewirkt. Allerdings zeigen frühe Studien, dass Carvedilol zu keiner Heraufregulation kardialer  $\beta$ -AR führt, während die Behandlung mit Metoprolol die Dichte der kardialen  $\beta$ -AR wieder rekonstituiert (Gilbert et al., 1993). In einer früheren Studie unserer Gruppe beobachteten wir, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz, die mit Carvedilol oder Metoprolol behandelt wurden, das Herzzeitvolumen durch den  $\beta_1$ -AR Agonisten Dobutamin in gleichem Ausmaß (+40%) gesteigert wurde (Maack et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass Carvedilol zu einer Resensibilisierung kardialer  $\beta_1$ -AR führt, die unabhängig von der Rekonstitution der  $\beta$ -AR Dichte im Myokard von Statten gehen muss.

Wegen der unzureichenden Verfügbarkeit von LV Myokard wurde die vorliegende Studie an humanem atrialen Myokard durchgeführt. Tatsächlich beobachteten wir bei 66 unterschiedlichen Geweben eine Heterogenität der Sensibilität kardialer  $\beta_1$ -AR, die mit dem Alter und einer begleitenden Therapie der Patienten mit  $\beta$ -Blockern assoziiert war. Aus früheren Studien an Ratten Kardiomyozyten ist bekannt, dass die Sensibilität kardialer  $\beta$ -AR im Alter abnimmt, was nicht auf eine erhöhte Expression

der G-Protein Rezeptor Kinase 2 (GRK2, oder auch  $\beta$ ARK1) oder des inhibitorischen G-Proteins zurückzuführen war (Xiao et al., 1998). Wichtigster Befund war hierbei eine Herabregulation der Rezeptordichte und eine Abnahme der Adenylatzyklasen Aktivität. Die Sensibilisierung des  $\beta_1$ -AR bei Patienten, die vor Gewebeentnahme mit  $\beta$ -Blockern (in unserer Studie überwiegend Metoprolol und Bisoprolol; kein Patient mit Carvedilol) behandelt wurden, deckt sich prinzipiell mit der Beobachtung, dass eine  $\beta$ -Blockertherapie zur Heraufregulation kardialer  $\beta$ -AR und einer Verbesserung der maximalen Sauerstoffaufnahme unter Belastung führt, einem Parameter, der eng mit der kardialen  $\beta$ -AR Dichte korreliert (White et al., 1995). Diese Daten legen nahe, dass das gewählte experimentelle System (Vorhofmyokard) wichtige Gemeinsamkeiten mit LV Myokard aufweist und somit für mechanistische Untersuchungen zur Identifikation der Wirkmechanismen verschiedener  $\beta$ -Blocker gut geeignet ist.

Es ist bekannt, dass an LV Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz die Dichte der  $\beta$ -AR vermindert ist (Bristow et al., 1982b) und die verbleibenden Rezeptoren hinsichtlich einer Agonistenstimulation desensibilisiert sind (Hausdorff et al., 1990). Da das untersuchte Myokard jedoch nicht von schwer herzinsuffizienten Patienten stammte, und auch keine Korrelation zwischen (der meist noch normalen bzw. nicht hochgradig eingeschränkten) LVEF und der Sensibilität kardialer  $\beta_1$ -AR bestand, erschien eine Herabregulation kardialer  $\beta$ -AR *per se* keine hinreichende Erklärung für den dokumentierten Effekt zu sein. Daher suchten wir nach weiteren Mechanismen, die für die Desensibilisierung des atrialen Myokards verantwortlich sein könnten.

In unseren Experimenten beobachteten wir, dass durch die Inhibition der PDE4 und/oder der PI3-Kinase die Desensibilisierung sowie die Abnahme der Kontraktionskraft nach Erreichen des Maximums komplett aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der sekundären Abnahme der Kontraktionskraft sowie der  $\beta_1$ -AR Desensibilisierung ein Signalweg zugrunde liegt, der die PI3-Kinase sowie die PDE4 involviert. Da keine additive Sensibilisierung durch die kombinierte Hemmung der PI3-Kinase und der PDE4 erreicht werden konnte, wird geschlussfolgert, dass PI3-Kinase und PDE4 Komponenten desselben Signalwegs sein müssen, der die Desensibilisierung kardialer  $\beta_1$ -AR mediiert.

Zellphysiologische Experimente zeigten bereits, dass die Aktivierung von  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu einer Stimulation der PI3-Kinase führen kann (Naga Prasad et al., 2001). Als wichtiges downstream Target der PI3-Kinase eignet sich die Akt-Phosphorylierung an Serin-Rest 473 zur Abschätzung einer PI3-Kinase Aktivierung (Xie et al., 2000). In unseren Herzmuskeltrabekeln kam es nach Noradrenalin-vermittelter Stimulation von  $\beta_1$ -AR tatsächlich zu einer transienten Zunahme der Akt-Phosphorylierung, die durch Koinkubation mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY komplett inhibiert werden konnte. Bisherige Studien zeigten überwiegend eine Stimulation der PI3-Kinase, die nach Aktivierung des  $\beta_2$ -AR über die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des inhibitorischen G-Proteins mediiert war (Jo et al., 2002). Einzig eine Studie an Rattenkardiomyozyten suggerierte bisher, dass auch der  $\beta_1$ -AR über die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des *stimulatorischen* G-Proteins die PI3-Kinase stimulieren könnte (Leblais et al., 2004). Die Daten unserer Studie untermauern dieses Konzept funktionell als auch biochemisch, insbesondere angesichts der LY-vermittelten Inhibition der Noradrenalin-induzierten Akt-Phosphorylierung, und sind die ersten Ergebnisse, die diese Kopplung zwischen  $\beta_1$ -AR und PI3-Kinase am menschlichen Myokard beschreiben.

Obwohl die Daten von (Leblais et al. 2004) auf einen Einfluss der PI3-Kinase auf die  $Ca^{2+}$  Transienten und Zellverkürzung hinweisen, konnte der genaue Mechanismus in jener Studie nicht hinreichend geklärt werden. Daten von Mäusen, die eine genetische Modifikation der PI3-Kinase  $\alpha$  oder  $\gamma$  aufweisen, zeigten eine Regulation von cAMP durch die PI3-Kinase  $\gamma$ -, aber nicht  $\alpha$ -Untereinheit (Crackower et al., 2002). Neuere Daten dieser Gruppe zeigten in folgenden Jahren, dass diese Regulation von cAMP durch die PDE4 mediiert wird (Kerfant et al., 2007). In Mäusen und anderen Nagetieren spielt allerdings die PDE4 quantitativ eine größere Rolle für die cAMP Regulation als im menschlichen Myokard. Dies wird u.a. dadurch ersichtlich, dass in Mäusen und Rattenkardiomyozyten die Inhibition der PDE4 mit dem Inhibitor Rolipram in der Abwesenheit eines  $\beta_1$ -AR Agonisten bereits einen Anstieg der Zellverkürzung bzw. Kontraktilität hervorruft, und der Effekt einer Inhibition der PDE4 mit Rolipram einen größeren Effekt auf die  $\beta_1$ -AR mediierte Bildung von cAMP hatte als eine Inhibition von PDE3 (Nikolaev et al., 2006). Verschiedene Daten am menschlichen Myokard, zuletzt durch Richter et al. 2011, zeigen jedoch eine dominante Rolle der PDE3 gegenüber der PDE4 in humanem

atrialen Myokard (Richter et al., 2011). Dies spiegelt sich in unseren Experimenten dadurch wider, dass die Inhibition der PDE3 einen positiv inotropen Effekt auslöst, während die Inhibition der PDE4 durch Rolipram keinen Einfluss auf die Kontraktilität hatte. Dies suggeriert, dass in der Abwesenheit eines Agonisten die PDE3, aber nicht die PDE4, eine endogene konstitutive Aktivität aufweist. Die PDE4 hingegen weist in der Abwesenheit eines Agonisten keine relevante konstitutive Aktivität auf, sonst hätte man nach PDE4-Inhibition bereits einen positiv inotropen Effekt erwartet. Die Aktivierung der PDE4 erfordert nach unseren Ergebnissen eine Rezeptor-induzierte Aktivierung. Der klassische Weg der PDE4-Aktivierung ist durch die PKA (Sette and Conti, 1996); wenn dies der Mechanismus für die Aktivierung in unseren Experimenten wäre, so hätte man erwarten können, dass auch durch Zugabe von Forskolin, welches unabhängig von der  $\beta$ -AR Aktivierung die Adenylatzyklase aktiviert und zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der PKA führt, ein biphasischer inotroper Effekt zu beobachten gewesen wäre. Dies war allerdings in einer größeren Serie von Experimenten (durch Philip Böhmer aus unserer Arbeitsgruppe; nicht gezeigt) nicht der Fall, was eine PKA-medierte PDE4 Aktivierung als relevanten Mechanismus in unserem System unwahrscheinlich macht.

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der Kontraktilität nach Erreichen des Maximums tatsächlich auf einen PDE-medierten Abbau von cAMP zurückzuführen ist, führten wir Experimente in der Abwesenheit und Gegenwart verschiedener PDE-Inhibitoren durch. In der Tat konnte der sekundär negativ inotrope Effekt nach Erreichen des Maximums nach  $\beta_1$ -AR Stimulation durch sowohl PDE3- als auch PDE4-Inhibitoren komplett aufgehoben werden. Allerdings hatte die Inhibition der PDE3 mit Milrinon an sich bereits in der Abwesenheit des Agonisten einen positiv inotropen Effekt. Die Ausgangskraft der Trabekel, die einen biphasischen Verlauf ihrer Kontraktilität erfuhren, war allerdings identisch zu der Ausgangskraft der Trabekel, die einen monophasischen Anstieg der Kontraktilität hatten, und auch die maximal entwickelte Kraft bei hohen Agonistenkonzentrationen (d.h., die Effizienz von Noradrenalin), war nicht unterschiedlich zwischen Geweben mit mono- und biphasischem Kontraktilitätsverläufen. Darüber hinaus kam es nach Inhibition der PDE3 zu einer Resensibilisierung der  $\beta_1$ -AR über das Niveau der Kontrollgruppe mit normaler  $\beta_1$ -AR Affinität hinaus. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition der PDE4

keinen inotropen Effekt an sich, und die  $\beta_1$ -AR Sensibilität gegenüber Noradrenalin wurde auf exakt den Wert resensibilisiert, der in der (nicht desensibilisierten) Kontrollgruppe zu finden war. Diese Daten legen nahe, dass eher eine Rezeptorvermittelte Aktivierung der PDE4 als die der bereits konstitutiv aktiven PDE3 die Unterschiede zwischen den Geweben mit mono- und biphasischem Kontraktilitätsverlauf erklären kann. Die Tatsache, dass die Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 einen identischen Effekt wie Rolipram hatte und bei gemeinsamer Inkubation kein additiver Effekt zu verzeichnen war, lässt den Schluss zu, dass PI3-Kinase und PDE4 Teile derselben Signalkaskade sind.

In weiteren Experimente unserer Arbeitsgruppe (Doktorarbeit Nico Wannemacher) fanden wir heraus, dass die Stimulation der PI3-Kinase upstream der PDE4-Aktivierung liegen muss, da die  $\beta_1$ -AR-medierte Phosphorylierung der Akt (als downstream target der PI3-Kinase) zwar mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002, aber nicht mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram verhindert werden konnte. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser experimentellen Serie, dass das Ausmaß der basalen Akt Phosphorylierung in unterschiedlichen Geweben (als möglicher Ausdruck unterschiedlicher konstitutiver PI3-Kinase Aktivität) einen engen Zusammenhang mit der basalen und der maximal durch Isoprenalin-induzierten Kraftentwicklung hatte. Diese Ergebnisse könnten die Heterogenität der Gewebe hinsichtlich  $\beta_1$ -AR Sensibilität und der Charakteristik des inotropen Ansprechens auf Noradrenalin (monophasisch versus biphasisch) zumindest teilweise erklären. Da eine Reihe von Signalkaskaden auf die PI3-Kinase als molekulare „Schnittstelle“ einwirken, könnte dies durch Unterschiede in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Grundbedingungen der Patienten (z.B. Inflammation, neuroendokrine Aktivierung, unterschiedliche metabolische Situationen etc.), aber auch die unterschiedlichen und unvorhersehbaren Einflüsse verschiedener Medikamente (Medikation der Patienten, unterschiedliche Konzentrationen und Kombination von Narkotika, Insulin etc.) zurückzuführen sein.

Der beobachtete biphasische Verlauf der kardialen Kontraktilität nach Zugabe kumulativer Agonisten Konzentrationen war – insbesondere zu Beginn unserer Studien 2005 – eher überraschend, war doch eher ein kontinuierlicher positiv inotroper Effekt nach Agonistenzugabe der erwartete Effekt. Die Entwicklung neuerer

Technologien (insbesondere durch die Verwendung von Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, kurz FRET) zur Detektion subzellulärer cAMP Konzentrationen ermöglichte in den letzten Jahren jedoch tiefere Einblicke in die Regulation unterschiedlicher cAMP „Pools“, die eine Erklärung für die von uns beobachteten Effekte auf die kardiale Kontraktilität leisten könnten. So zeigten bereits 2002 Zaccolo & Pozzan, dass es nach anhaltender  $\beta$ -adrenerger Stimulation neonataler Kardiomyozyten zu einem nur transienten Anstieg lokaler cAMP Konzentrationen kam, deren zeitlicher Verlauf dem der Abnahme der kardialen Kontraktilität in unseren Studien ähnelte. In dieser Studie hemmten verschiedene PDEs die Ausbreitung des zellulären cAMP in räumlicher und zeitlicher Weise, was den Grundstein für weitere Forschung zur subzellulären cAMP Regulation in sog. Mikrodomänen legte (Zaccolo and Pozzan, 2002). Eine neuere Studie von (De Arcangelis et al. 2010) bestätigte diese Beobachtung an neonatalen Kardiomyozyten und machte darüber hinaus die Beobachtung, dass entsprechend auch die Aktivität der PKA, welche durch cAMP phosphoryliert und aktiviert wird, trotz anhaltender Gegenwart des Agonisten am Rezeptor ebenfalls nur transient ansteigt (De Arcangelis et al., 2010). Weiterhin beobachteten sie, dass dieser transiente Anstieg von cAMP bei submaximalen Agonisten Konzentrationen am stärksten ausgeprägt war, während bei höheren Agonisten Konzentrationen die cAMP Konzentration und PKA Aktivität anhaltend erhöht blieb, ohne nach Erreichen des Maximums wieder abzunehmen. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass auch die Kontraktionskraft in humanen atrialen Trabekeln bei höheren Agonisten Konzentrationen von Noradrenalin auch in der Gruppe erhöht blieb, die bei submaximalen Konzentrationen des Agonisten noch einen biphasischen Verlauf gezeigt hatten.

Als Erklärung für dieses Phänomen zeigten Arcangelis et al. (2010), dass die PDE4 mit dem  $\beta_1$ -AR in einem Komplex, der auch die Adenylat Zykklase (AC) beinhaltet, assoziiert ist. Diese enge räumliche Assoziation von  $\beta_1$ -AR, PDE4 und AC würde demnach eine Limitation der subsarkolemmalen cAMP Ausbreitung nach  $\beta_1$ -AR-induzierter AC Stimulation bedeuten. Interessanterweise kommt es bei höheren Agonisten-Konzentrationen zu einer Dissoziation der PDE4 aus dem Komplex mit  $\beta_1$ -AR und AC, was das Anhalten der hohen cAMP Konzentrationen und PKA Aktivität erklären könnte (De Arcangelis et al., 2010). Dieses Konzept wurde auf

biochemischer Ebene bereits 2 Jahre zuvor durch Richter et al. beschrieben (Richter et al., 2008).

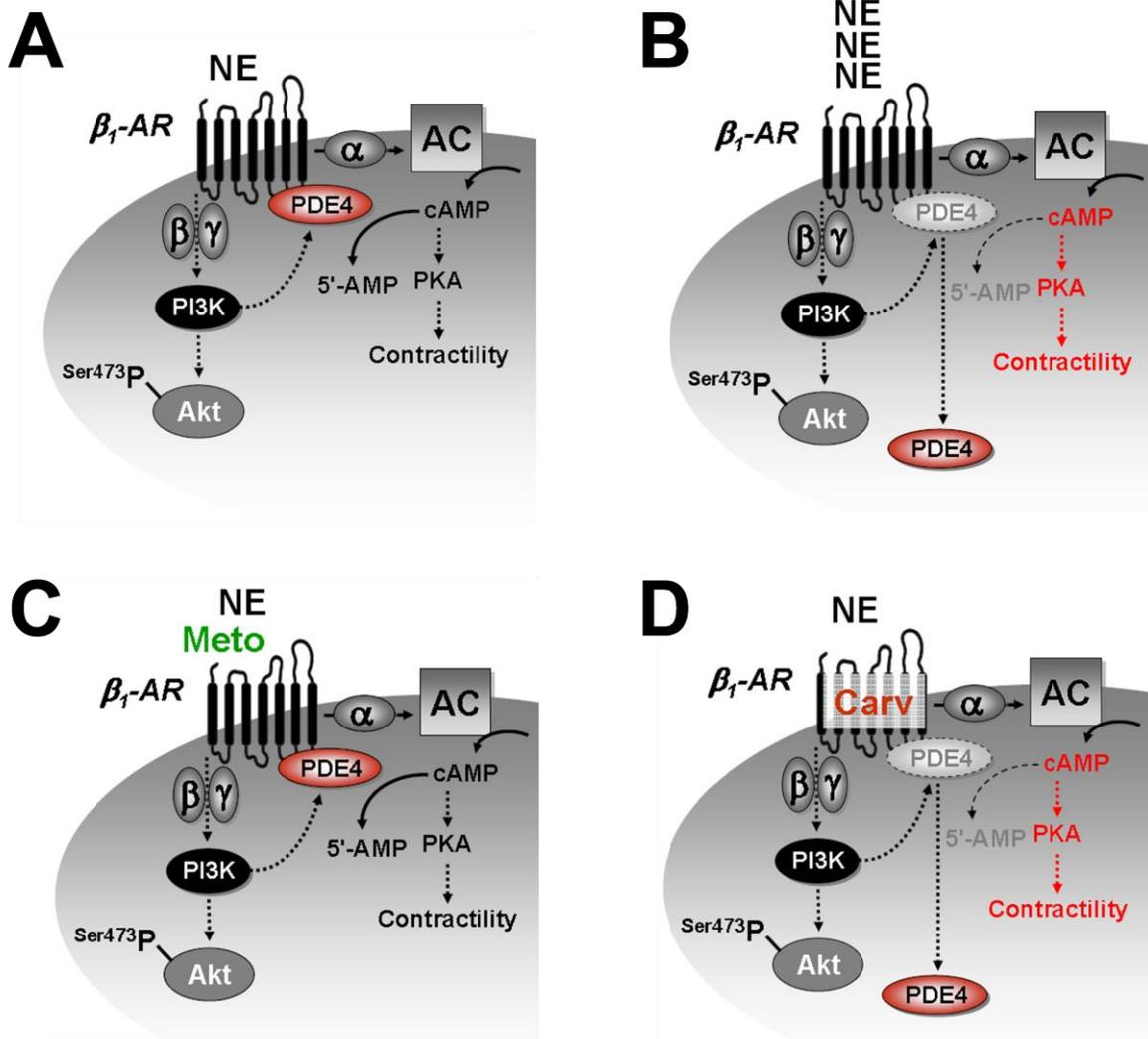
Der Komplex aus  $\beta_1$ -AR/AC/PDE4 ist in der Zellmembran lokalisiert, in der insbesondere der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal zum  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über die Zellmembran zur Regulation der Inotropie beiträgt. In einer aktuellen Studie wurde darüber hinaus beobachtet, dass sowohl PDE4D als auch PDE4B mit dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal assoziiert sind, dass dieser allerdings primär durch PDE4B und weniger durch PDE4D reguliert wird (Leroy et al., 2011). Es ist somit zu vermuten, dass der Komplex aus  $\beta_1$ -AR, AC und PDE4 über die (lokale) PKA auch einen wichtigen Einfluss auf den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal und somit den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zelle hat. Neben dieser subsarkolemmalen cAMP Mikrodomäne existieren darüber hinaus auch cAMP Mikrodomänen im Bereich der Ryanodin Rezeptoren und der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase/Phospholamban am SR, welche nach L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal vermittelter Triggerung des RyR eine noch größere  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttung medieren. Durch die dreidimensionale Durchspannung von *ventrikulären* Kardiomyozyten durch T-Tubuli gelangt bei einem Aktionspotenzial der  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle auch weit „in das Innere“ der Zelle zu den Dyaden (aus RyR und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal), was einen homogenen  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten in der ganzen Zelle auslöst. Im Gegensatz dazu haben *atriale* Kardiomyozyten ein wesentlich rudimentärer ausgebildetes T-tubuläres Netzwerk, so dass während des Aktionspotenzials nur ein subsarkolemmaler  $\text{Ca}^{2+}$  Transient auftritt (Mackenzie et al., 2004). Die zentripetale Propagation dieses subsarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten wird hierbei durch eine räumliche Barriere aus SR und Mitochondrien limitiert, die das anflutende  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aufnehmen und an der Diffusion ins Zellinnere hindern; erst bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation überkommt der subsarkolemmale (L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal getriggerte)  $\text{Ca}^{2+}$  Transient diese räumliche Barriere, was zur zentripetalen Ausbreitung desselben und somit zur „Rekrutierung“ zentral gelegener Myofilamente zur Kontraktion der Zelle führt (Mackenzie et al., 2004).

Da unsere funktionellen Experimente ausschließlich an atrialem Myokard durchgeführt wurden, könnte somit die Regulation subsarkolemmaler cAMP pools bzw. L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal Aktivitäten einen wesentlich höheren Anteil an der globalen Kontraktilität einzelner Herzmuskelzellen haben, als dies in ventrikulären

Kardiomyozyten der Fall wäre, in denen 70% des  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten durch Freisetzung aus dem SR beigetragen werden (und bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein sogar noch höherer Anteil), doch die SR-assoziierten  $\text{Ca}^{2+}$  transportierenden Systeme durch einen anderen cAMP pool reguliert werden. Eine Beobachtung unserer Studien unterstützt die Überlegung, dass in unserem System die Rezeptor-induzierte Aktivierung der PDE4 eher die subsarkolemmalen (also L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal vermittelten) als die SR-assoziierten Prozesse reguliert: Die Noradrenalin-induzierte Zunahme der Kontraktilität war stets mit einer Beschleunigung der Anstiegsgeschwindigkeit der Kontraktion, aber auch einer Beschleunigung der Relaxation assoziiert. Letztere wird insbesondere durch SERCA-medierte  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme ins SR kontrolliert. Obwohl es in den Trabekeln mit biphasischem Kontraktionsverlauf zu einer (PDE4-abhängigen) Abnahme der Amplitude der Kontraktion kam, so nahm die Relaxationsgeschwindigkeit nicht ab (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass zwar die in atrialen Myozyten maßgebenden L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal Ströme durch PDE4 reguliert werden, aber weniger die SR-assoziierten RyR und Phospholamban, da ansonsten auch eine Verlangsamung der Relaxation beobachtet worden wäre. Diese Zusammenhänge sollten jedoch durch Bestimmung der Phospholamban Phosphorylierung bzw. durch Bestimmung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal Strömen in zukünftigen Studien untermauert werden.

Zusammenfassend postulieren wir daher auf der Basis der Daten der vorliegenden Arbeit sowie der beschriebenen Studien, dass in humanem atrialen Myokard die Stimulation des  $\beta_1$ -AR zu einer  $G_{s\alpha}$ -medierten Stimulation der AC führt, was zunächst den Anstieg von cAMP mit resultierender Aktivierung der PKA mediert, und letztlich zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Transienten und der kardialen Kontraktilität führt. Gleichzeitig wird jedoch über die Stimulation des  $\beta_1$ -AR, vermutlich über die Vermittlung durch  $G_{\beta\gamma}$  Komplexe, die PI3-Kinase aktiviert, die dann wiederum zu einer Aktivierung der PDE4 führt, die mit dem  $\beta_1$ -AR assoziiert ist. Hierdurch kommt es zur zweizeitigen Abnahme der subsarkolemmalen cAMP Spiegel und einer Abnahme der Kontraktilität (Abbildung 33A).

Bei höheren Agonisten Konzentrationen dissoziiert die PI3K-aktivierte PDE4 vom  $\beta_1$ -AR ab, wodurch es zu einer anhaltenden Erhöhung der subsarkolemmalen cAMP Konzentrationen und hierdurch auch der Kontraktilität kommt (siehe Abbildung 33B).



**Abbildung 33:** Schematische Darstellung der  $\beta_1$ -AR Aktivierung und der Einfluss von Metoprolol und Carvedilol auf diese Aktivierung in Kardiomyozyten, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer Arbeiten. **A**, Geringe bis mittlere Norepinephrin (NE) Konzentrationen führen über  $G_{\alpha s}$  zu einer Stimulation der Adenylatzyklase und hierüber zu einer Zunahme von cAMP, PKA Aktivität und Kontraktilität. Gleichzeitig führen die  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheiten zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, wodurch zum einen Akt phosphoryliert wird, zum anderen aber auch die PDE4. Diese mit dem  $\beta_1$ -AR assoziierte PDE4 hydrolysiert nun zunehmend cAMP, was zu einer zweizeitigen Abnahme der subsarkolemmalen cAMP Spiegel führt, was (insbes. bei atrialen Kardiomyozyten) zu einer Abnahme des positiv inotropen Effektes führt. **B**, bei hohen Noradrenalin Konzentrationen (100  $\mu$ M) kommt es zu einer Dissoziation der PDE4 von  $\beta_1$ -AR, was zu einer verringerten Hydrolyse subsarkolemmaler cAMP Spiegel und somit zu einem anhaltenden positiv inotropen Effekt führt. **C**, Das Binden von Metoprolol an kardiale  $\beta_1$ -AR führt über kompetitiven Antagonismus eine Rechtsverschiebung der Noradrenalin Effekte aus, ohne jedoch die  $G_{\beta\gamma}$ -abhängige PDE4 Aktivierung bzw. PDE4-Dissoziation vom  $\beta_1$ -AR zu beeinflussen. **D**, im Gegensatz dazu bindet Carvedilol nicht an die orthosterische, sondern eher an eine allosterische Bindungsstelle des Rezeptors, was eine frühere Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR (bei geringeren Noradrenalin Konzentrationen) herbeiführt und somit schon im physiologischen Agonisten-Bereich zu einer Verringerung der PDE4-abhängigen Hydrolyse von subsarkolemmalem cAMP und somit ein Anhalten der Kontraktionskraft verantwortet.

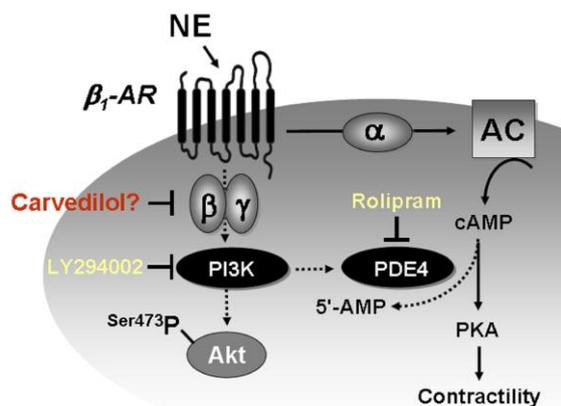
## 5.2. Effekte von Carvedilol und Metoprolol auf den PI3-Kinase und PDE4-abhängigen Signalweg

In unseren initialen Experimenten beobachteten wir, dass Carvedilol eine wesentlich langsamere Assoziationskinetik zum  $\beta$ -AR besitzt als Metoprolol, da Carvedilol erst nach 90 min Vorinkubation eine volle  $\beta$ -Blockade entfaltete. Im Gegensatz dazu blockierte Metoprolol bereits nach wenigen Minuten die kardialen  $\beta$ -AR. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Daten unserer Arbeitsgruppe (Kindermann et al., 2004), in denen wir auch eine nahezu irreversible Dissoziationskinetik von Carvedilol am  $\beta$ -AR beobachteten, die sich auch klinisch durch anhaltende  $\beta$ -Blockade selbst 44 h nach Absetzen der Medikation in gesunden Probanden bemerkbar machte (auch nach kompletter Elimination von Carvedilol aus dem Plasma bei einer Halbwertszeit von 5.5 h). Interessanterweise beobachteten wir, dass nur wenige Minuten der Präinkubation mit Carvedilol selbst in Gewebe mit normal sensitiven  $\beta$ -AR eine leichte Linksverschiebung der Isoprenalin Konzentrations-Wirkungskurve hervorrief, was noch wesentlich stärker in Gewebe mit desensibilisierten  $\beta$ -AR ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu kam es nach Vorinkubation mit Metoprolol immer zu einer Rechtsverschiebung der  $\log EC_{50}$  in Geweben mit normal sensiblen  $\beta$ -AR, im Sinne eines kompetitiven Antagonismus, während in Geweben mit desensibilisierten  $\beta$ -AR zumindest keine Linksverschiebung, sondern eher eine Rechtsverschiebung auftrat (siehe Abbildung 33).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ursache für diese Resensibilisierung durch Carvedilol zu untersuchen. Hierfür wurden die Protokolle mit selektiver Aktivierung von  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR durch Noradrenalin und Adrenalin durchgeführt. Am  $\beta_1$ -AR beobachteten wir, dass in etwa der Hälfte der Gewebe ein biphasischer inotroper Effekt auftrat, mit einer Abnahme der Kontraktilität nach Erreichen des initialen Maximums, während in der anderen Hälfte der Gewebe die Kontraktionskraft nach Erreichen des Maximums weitgehend konstant blieb. Gewebe, in denen ein biphasischer Kontraktionskraftverlauf auftrat, hatten ein desensibilisiertes Ansprechen der  $\beta_1$ -AR auf Noradrenalin. Das Ausmaß des sekundär negativ inotropen Effektes war mit dem Ausmaß der Desensibilisierung der  $\beta_1$ -AR assoziiert. Dies weist darauf hin, dass die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft ein Prozess sein könnte, der gleichzeitig auch zur Desensibilisierung des  $\beta_1$ -AR beitragen könnte. Wie oben bereits erläutert, führten wir

die sekundäre Abnahme der Kraft auf eine PI3-Kinase-vermittelte Aktivierung der (unter basalen Bedingungen nicht aktiven) PDE4 zurück. Daten anderer Gruppen weisen darauf hin, dass die PDE4 mit dem  $\beta_1$ -AR assoziiert ist und bei geringen Agonisten Konzentrationen den subsarkolemmalen Anstieg von cAMP räumlich und zeitlich eingrenzt (De Arcangelis et al., 2010). Erst bei sehr hohen Agonisten Konzentrationen dissoziiert die PDE4 vom  $\beta_1$ -AR und lässt eine anhaltende Erhöhung von cAMP und eine anhaltende Aktivierung der PKA zu (De Arcangelis et al., 2010; Richter et al., 2008). Interessanterweise wurde durch Carvedilol die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft sowohl am  $\beta_1$ -AR als auch am  $\beta_2$ -AR aufgehoben, während Metoprolol lediglich zu einer Rechtsverschiebung des Noradrenalin Effektes führte und den biphasischen Kontraktionskraftverlauf nicht beeinflusste. Wir spekulierten daher, dass die Resensibilisierung kardialer  $\beta$ -AR durch Carvedilol auf eine Beeinflussung des PI3-Kinase/PDE4-abhängigen Signalweges zurückzuführen ist. Um dies mechanistisch zu klären, führte unsere Arbeitsgruppe noch weitere Experimente durch, die nicht durch mich selber durchgeführt wurden, deren Ergebnisse aber hier zum Verständnis der durch mich durchgeführten funktionellen Experimente diskutiert werden sollen.

### 5.2.1. Inhibiert Carvedilol die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Gs und somit die PI3K-Aktivierung?



**Abbildung 34:** Inhibiert Carvedilol die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Gs und somit die PI3K-Aktivierung?

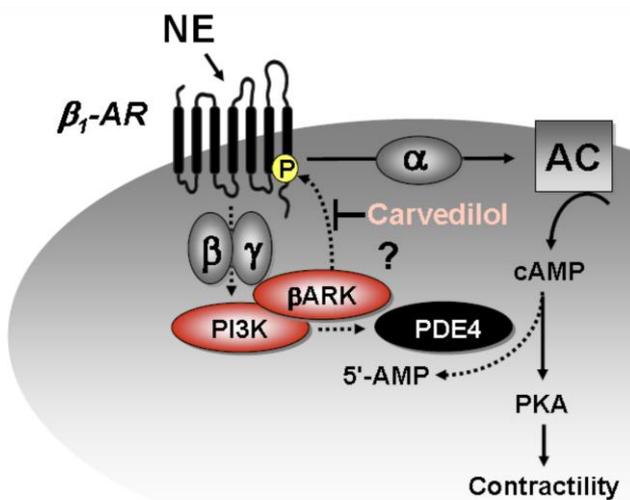
Zunächst spekulierten wir, dass Carvedilol durch seine Assoziation mit dem  $\beta$ -AR die Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nach Agonisten-Stimulation des Rezeptors unterbinden bzw. deren vermutete Aktivierung der PI3-Kinase verhindern könnte (Abbildung 34). Um dies zu testen, führten wir Experimente an isolierten atrialen Trabekeln durch, die mit Isoprenalin in der Gegenwart des  $\beta_2$ -AR Antagonisten

ICI 118.551 (zur selektiven  $\beta_1$ -AR Stimulation) für 15 min inkubiert wurden. Dies

erfolgte in der Abwesenheit und Gegenwart von Carvedilol, LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor), und Rolipram (PDE4-Inhibitor). Die Trabekel wurden nach 15 min schockgefroren und die Phosphorylierung von Akt als wichtigem downstream Target der PI3-Kinase analysiert (Western-Blot).

Es zeigte sich, dass durch  $\beta_1$ -AR Stimulation die Phosphorylierung von Akt zunahm, was einer Aktivierung der PI3-Kinase entspricht. Dies wurde durch Vorinkubation mit LY294002, aber nicht Rolipram verhindert, was darauf hinweist, dass die PDE4 downstream der PI3-Kinase liegt. Auch die Vorinkubation mit Carvedilol verhinderte die Akt-Phosphorylierung nicht, was zum einen zeigt, dass (in Übereinstimmung mit den Kontraktilitätsdaten) die  $\beta_1$ -AR Stimulation als solche und die downstream gelegene PI3-Kinase Aktivierung nicht verhindert wird. Weiterhin lässt dies jedoch auch den Schluss zu, dass Carvedilol nicht die vermutete  $\beta\gamma$ -Dissoziation und hierdurch vermutlich vermittelte PI3-Kinase Aktivierung verhindert

### 5.2.2. Inhibiert Carvedilol die $\beta$ ARK-assoziierte PI3-Kinase Aktivität?



**Abbildung 35:** Inhibiert Carvedilol die  $\beta$ ARK-assoziierte PI3-Kinase Aktivität?

Naga Prasad et al. beobachteten, dass nach  $\beta$ -AR Stimulation die G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase 2 (GRK2; Synonym  $\beta$ -AR Kinase 1,  $\beta$ ARK1) mit der PI3-Kinase assoziiert ist, gemeinsam zum  $\beta$ -AR transloziert und hier eine Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt, die zur homologen Desensibilisierung und Sequestration des Rezeptors führt (Naga Prasad et al., 2001) (Abbildung 35). In Mäusen wurde

beobachtet, dass es nach *in vivo* Applikation von Isoprenalin zu einer initialen Zunahme der Kontraktilität ( $+dP/dt_{max}$ ) und Relaxationsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{max}$ ) kam, die dann innerhalb von 20 min wieder fast komplett rückläufig war. Dieser biphasische Verlauf der  $\beta$ -AR vermittelten Inotropie ähnelt stark den von uns

beobachten Verläufen in desensibilisierten Trabekeln, was Ausprägung und Kinetik des Effektes anbelangt. Interessanterweise wurde in diesen Studien durch Kardiomyozyten-spezifische Deletion der GRK2 ( $\beta$ ARK1) die sekundäre Abnahme der Kontraktilität deutlich abgeschwächt, was darauf hinweist, dass der GRK2 eine wichtige Rolle bei dieser sekundären Kontraktionskraftabnahme zukommt. Da wir keinen Effekt von Carvedilol auf die PI3-Kinase-vermittelte Phosphorylierung von Akt beobachteten, spekulierten wir daher, dass Carvedilol stattdessen die  $\beta$ ARK1-assoziierte PI3-Kinase Aktivität beeinflussen bzw. reduzieren könnte. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Naga Prasad (Cleveland, Ohio, USA; Doktorarbeit Nico Wannemacher) führten wir daher Experimente durch, bei denen in isolierten und Langendorff-perfundierten Rattenherzen Isoprenalin für 15 min in der Abwesenheit und Gegenwart von Carvedilol, Metoprolol, LY294002 und Rolipram appliziert wurde und anschließend das Gewebe für die Bestimmung der  $\beta$ ARK1-assoziierten PI3-Kinase Aktivität verarbeitet wurde. Es zeigte sich, dass durch die Vorinkubation mit LY294002, aber nicht durch Carvedilol, die  $\beta$ ARK1-assoziierte PI3-Kinase Aktivität verringert werden konnte. Dies zeigt, dass Carvedilol keinen Einfluss auf diesen Signalweg nimmt und daher dies auch nicht die Erklärung für die Resensibilisierung kardialer  $\beta_1$ -AR durch Carvedilol ist.

### 5.2.3. Inhibiert Carvedilol direkt die PDE4?

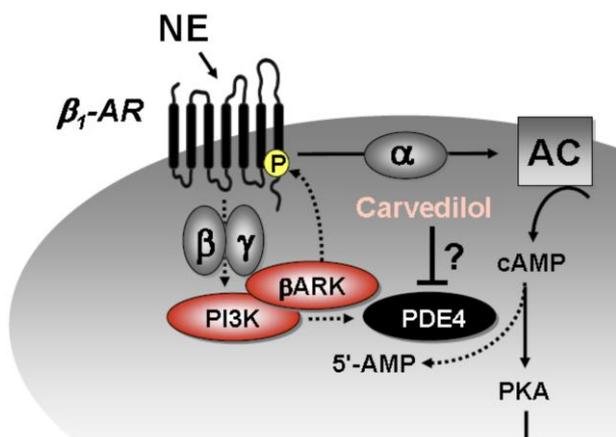


Abbildung 36: Inhibiert Carvedilol direkt die PDE4?

Eine weitere Möglichkeit wäre die direkte Inhibition der PDE4-Aktivität durch Carvedilol. Um dies zu testen, kooperierte unsere Gruppe mit Erik Qvigstad (Universität Oslo, Norwegen), der an humanem atrialen Myokard die Aktivität der PDE2, PDE3 und PDE4 in der Abwesenheit und Gegenwart von Carvedilol untersuchte. In Übereinstimmung mit

unseren funktionellen Daten und biochemischen Daten von Richter et al. (2010) beobachteten diese, dass die PDE3 den höchsten Beitrag zur Gesamt-PDE-Aktivität in menschlichem Myokard zukommt, im Gegensatz zu Maus- oder Rattenmyokard, in

dem die PDE4 die dominierende Rolle spielt (Nikolaev et al., 2006). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Carvedilol weder die PDE2, PDE3 noch die PDE4 inhibierte. Somit schied auch die Möglichkeit aus, dass Carvedilol durch direkte Inhibition der PDE4 den beobachteten funktionellen Effekt der Resensibilisierung bewerkstelligte.

#### **5.2.4. Carvedilol erleichtert die Dissoziation der PDE4 vom $\beta_1$ -AR**

Nach dem Erscheinen der Arbeit von Richter et al. (2008), in dem die Assoziation der PDE4 mit dem  $\beta_1$ -AR sowie deren Dissoziation bei hohen Agonisten Konzentrationen gezeigt wurde, und insbesondere nach dem Erscheinen der Arbeit von De Arcangelis et al. (2010), in dem die funktionelle Relevanz dieses Phänomens für subsarkolemmale cAMP Konzentrationen und PKA-Aktivität beschrieben wurde, spekulierten wir, dass Carvedilol diese Assoziation zwischen  $\beta_1$ -AR und PDE4 beeinflussen könnte. In Kooperation mit Wito Richter und Marco Conti (University of California San Francisco, USA) wurden daher Co-Immunopräzipitations-Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss von Carvedilol auf die Assoziation zwischen  $\beta_1$ -AR und PDE4 untersucht wurden. Es zeigte sich, dass eine mittlere Konzentration des Agonisten Noradrenalin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) alleine – in Übereinstimmung mit seinen früher publizierten Daten (Richter et al., 2008) – noch zu keiner Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR führte, was in der Arbeit von (De Arcangelis et al., 2010) mit einem biphasischem Verlauf der cAMP Konzentrationen und PKA-Aktivierung assoziiert war. Im Gegensatz dazu kam es nach sehr hoher Agonisten-Konzentration (100  $\mu\text{mol/L}$  Noradrenalin) zu einer weitgehenden Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR, was in der Arbeit von De Arcangelis et al. (2010) mit einem anhaltenden Anstieg der cAMP Spiegel und PKA-Aktivität assoziiert war. Durch kurze Vorinkubation mit Carvedilol (10  $\text{nmol/L}$ , gleiche Konzentration wie in den funktionellen Studien der vorliegenden Studie) für 2 min kam es interessanterweise schon bei einer Noradrenalin-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  zu einer substantiellen Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR, deren Ausmaß mit der Dissoziation bei 100  $\mu\text{mol/L}$  Noradrenalin alleine vergleichbar war. Dies zeigt, dass Carvedilol die Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR bei mittleren (und vermutlich auch geringen) Noradrenalin Konzentrationen begünstigt, was eine Erklärung für die Beobachtung liefern könnte, dass bereits bei

mittleren und geringen Noradrenalin-Konzentrationen die Kontraktionskraft nach Erreichen des Maximums nicht wieder (PDE4-vermittelt) abnimmt (Abbildung 33D).

#### **5.2.5. Carvedilol potenziert den $\beta$ -AR Agonisten-induzierten Anstieg des subsarkolemmalen cAMP**

Um zu untersuchen, ob die durch Carvedilol begünstigte Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR auch tatsächlich einen Einfluss auf subsarkolemmale cAMP Konzentrationen hat, untersuchten wir in Kooperation mit Rodolphe Fischmeister (INSERM, Châtenay-Malabry, Frankreich) adulte Rattenkardiomyozyten, die durch adenoviralen Gentransfer mit dem cyclic nucleotide gated (CNG) Kanal infiziert waren. Dieser Kanal ist in Schrittmacherzellen des Herzens für die langsame Depolarisation verantwortlich, reguliert cAMP-abhängig die Herzfrequenz und ist die Zielstruktur einer Therapie mit Ivabradin. Der Strom dieses Kanals ( $I_{\text{CNG}}$ ) dient daher in infizierten adulten Kardiomyozyten, in denen er normalerweise nicht relevant exprimiert wird, der Detektion subsarkolemmalen cAMPs (siehe hierzu auch (Abi-Gerges et al., 2009)). In diesen Experimenten wurde beobachtet, dass durch den PDE4-Inhibitor Rolipram der Anstieg des subsarkolemmalen cAMPs bei zwei geringen bis mittelhohen Agonisten Konzentrationen (3 und 10 nmol/L Isoprenalin) deutlich potenziert wurde, und darüber hinaus eine nach Erreichen des Maximums eintretende Reduktion der cAMP Konzentrationen komplett verhindert wurde. Tatsächlich hatte eine 2-minütige Vorinkubation mit Carvedilol (10 nmol/L) einen identischen Effekt wie Rolipram, d.h., der Anstieg der subsarkolemmalen cAMP Konzentrationen wurde nicht nur potenziert, sondern auch die Abnahme nach Erreichen des Maximums komplett verhindert. Im Gegensatz dazu blockierte eine äquipotente Konzentration von Metoprolol komplett den  $\beta_1$ -AR induzierten Anstieg von cAMP. Diese Daten weisen darauf hin, dass Carvedilol, aber nicht Metoprolol, durch das Erleichtern der Dissoziation der PDE4 vom  $\beta_1$ -AR den Anstieg der subsarkolemmalen cAMP Konzentrationen bei submaximalen Agonisten-Konzentrationen potenziert und dessen PDE4-vermittelte Reduktion verhindern kann (Abbildung 33D). Da diese Effekte nicht durch Blockade der orthosterischen Bindungsstelle für Agonisten erklärbar ist (weil er zu einem Zeitpunkt auftritt, bevor  $\beta$ -AR durch Carvedilol blockiert sind), handelt es sich hierbei a.e. um einen allosterischen Effekt. Die Daten stellen eine Erklärung für unsere Beobachtung dar, dass durch Carvedilol die sekundäre Abnahme der Kontraktionskraft nach

Noradrenalin-vermittelter Zunahme der Kontraktilität verhindert wird und gleichzeitig eine Resensibilisierung der desensibilisierten  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion in menschlichem atrialen Myokard verursacht wird. Im Gegensatz dazu verhindert Metoprolol durch Binden an die orthosterische Bindungsstelle im kompetitiven Antagonismus mit dem Agonisten dessen eigentliche Aktivierung des Rezeptors und die dahinter geschaltete Signalkaskade, ohne jedoch auf die  $\beta_1$ -AR/PDE4 direkten Interaktion Einfluss zu nehmen (Abbildung 33C).

#### **5.2.6. Sind die Ergebnisse auch auf linksventrikuläres Myokard übertragbar?**

Um zu untersuchen, ob die Beobachtungen an humanem atrialen Myokard auch auf linksventrikuläres Myokard übertragbar sind, haben wir isolierte linksventrikuläre Trabekel eines Patienten mit chronischer terminaler Herzinsuffizienz mit kumulativen Noradrenalin Konzentrationen in der Abwesenheit und Gegenwart von Carvedilol, Metoprolol und dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 inkubiert (Experiment von Philip Böhmer). Am Ende aller Experimente wurde die extrazelluläre  $[Ca^{2+}]$  von 1.8 auf 15 mmol/L erhöht, um die maximal zu erzielende Kontraktilität in jedem Trabekel gesondert zu analysieren. Es zeigte sich, dass unter Kontrollbedingungen die Effektivität von Noradrenalin auf ~60% des maximalen  $Ca^{2+}$  Effektes reduziert war, in Übereinstimmung mit früheren Daten an menschlichem insuffizienten linksventrikulärem Myokard. Durch Vorinkubation mit Metoprolol kam es lediglich zu einer Rechtsverschiebung der Noradrenalin Konzentrations-Wirkungskurve im Sinne eines kompetitiven Antagonismus, ohne dass die Effektivität von Noradrenalin sich verbesserte. Im Gegensatz dazu führte die Vorinkubation mit LY294002 zu einer Wiederherstellung der Noradrenalin Effektivität auf annähernd 100% des  $Ca^{2+}$  Effektes ohne eine Beeinflussung der Noradrenalin Potenz. Das gleiche Ergebnis wurde nach 5-minütiger Vorinkubation mit Carvedilol erzielt: die Noradrenalin Effektivität wurde normalisiert, ohne dabei zu einer Rechtsverschiebung der Noradrenalin Affinität zu führen. Obwohl wir dieses Experiment aufgrund der in Homburg mittlerweile nicht mehr durchgeführten Herztransplantationen nur einmal durchführen konnten, so zeigt dieses Ergebnis dennoch, dass der in atrialem Myokard beobachtete resensibilisierende Effekt von Carvedilol auf  $\beta_1$ -AR durchaus auch auf LV Myokard übertragen werden könnte. Dies wird durch unsere Ergebnisse an LV Rattenkardiomyozyten unterstützt, in denen Carvedilol – prinzipiell in

Übereinstimmung mit dem Ergebnis in humanem LV Myokard – zu einer verbesserten Effektivität von Isoprenalin hinsichtlich der Erhöhung der subsarkolemmalen cAMP Konzentrationen geführt hatte.

Die Ergebnisse stellen somit eine Erklärung für die Beobachtung dar, dass die Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz mit Carvedilol zu einer vergleichbaren Sensibilisierung der kardialen  $\beta_1$ -AR wie Metoprolol führt, obwohl Carvedilol zu keiner Erhöhung der  $\beta_1$ -AR Dichte führt (Gilbert et al., 1993; Maack et al., 2001). Interessanterweise wird in der Gegenwart von Carvedilol das Herzzeitvolumen (HZV) durch eine Kombination aus gesteigerter Herzfrequenz und Schlagvolumen gesteigert, während in Metoprolol-behandelten Patienten der Anstieg des HZV nur durch den Anstieg der Herzfrequenz bewerkstelligt wurde. Dies könnte eine besonders effiziente Art der HZV-Erhöhung in der Gegenwart von Carvedilol bedeuten. Da mittlerweile sowohl für Metoprolol als auch Carvedilol die klinische Effektivität bei Patienten mit Herzinsuffizienz in einer Reihe von klinischen Studien gesichert wurde (insbesondere Verlängerung des Überlebens, Verbesserung der LV Funktion und Symptomatik), und trotz des Ergebnisses der COMET Studie kein gesicherter Vorteil der einen über die andere Substanz existiert, so helfen unsere Ergebnisse, die Mechanismen der  $\beta_1$ -AR Desensibilisierung besser zu verstehen. Darüber hinaus entlarven wir einen bisher nicht bekannten *allosterischen* Effekt von Carvedilol, da dieser nicht durch Bindung von Carvedilol an die *orthosterische* Bindungsstelle für Agonisten und Antagonisten erklärbar ist (sonst hätte man einen kompetitiven Antagonismus erwartet). Die Daten unterstützen die frühere Hypothese unserer Arbeitsgruppe, dass Carvedilol einen Teil seiner Effekte über das Binden an eine andere Bindungsstelle des Rezeptors bewirkt (Kindermann et al., 2004), was einem allosterischen Effekt entspricht.

## 6. Literaturverzeichnis

1. (1999). The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 353, 9-13.
2. Abi-Gerges, A., Richter, W., Lefebvre, F., Mateo, P., Varin, A., Heymes, C., Samuel, J.L., Lugnier, C., Conti, M., Fischmeister, R., Vandecasteele G. (2009). Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 105, 784-792.
3. Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
4. Borlaug, B.A., Paulus, W.J. (2011). Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J* 32, 670-679.
5. Bristow, M.R. (2011). Treatment of chronic heart failure with beta-adrenergic receptor antagonists: a convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology. *Circ Res* 109, 1176-1194.
6. Bristow, M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., Lurie, K., Billingham, M.E., Harrison, D.C., Stinson, E.B. (1982a). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307, 205-211.
7. Chesley, A., Lundberg, M.S., Asai, T., Xiao, R.P., Ohtani, S., Lakatta, E.G., and Crow, M.T. (2000). The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87, 1172-1179.
8. Cohn, J.N., Levine, T.B., Olivari, M.T., Garberg, V., Lura, D., Francis, G.S., Simon, A.B., Rector, T. (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311, 819-823.
9. Conti, M., Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76, 481-511.
10. Cooper, D.M. (2005). Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem Soc Trans* 33, 1319-1322.
11. Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J. *et al.* (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737-749.

12. De Arcangelis, V., Liu, S., Zhang, D., Soto, D., Xiang, Y.K. (2010). Equilibrium between adenylyl cyclase and phosphodiesterase patterns adrenergic agonist dose-dependent spatiotemporal cAMP/protein kinase A activities in cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* 78, 340-349.
13. De Arcangelis, V., Soto, D., Xiang, Y. (2008). Phosphodiesterase 4 and phosphatase 2A differentially regulate cAMP/protein kinase a signaling for cardiac myocyte contraction under stimulation of beta1 adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 74, 1453-1462.
14. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., Lohse, M.J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7059-7064.
15. Eriksson, H., Svardsudd, K., Larsson, B., Ohlson, L.O., Tibblin, G., Welin, L., Wilhelmsen, L. (1989). Risk factors for heart failure in the general population: the study of men born in 1913. *Eur Heart J* 10, 647-656.
16. Flesch, M., Ettlbrück, S., Rosenkranz, S., Maack, C., Cremers, B., Schlüter, K.D., Zolk, O., Böhm, M. (2001). Differential effects of carvedilol and metoprolol on isoprenaline-induced changes in beta-adrenoceptor density and systolic function in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 49, 371-380.
17. Flesch, M., Maack, C., Cremers, B., Baumer, A.T., Sudkamp, M., Böhm, M. (1999). Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation* 100, 346-353.
18. Gilbert, E.M., Olsen, S.L., Renlund, D.G., Bristow, M.R. (1993). beta-adrenergic receptor regulation and left ventricular function in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 71, 23C-29C.
19. Gretarsdottir, S., Thorleifsson, G., Reynisdottir, S.T., Manolescu, A., Jonsdottir, S., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Bjarnadottir, S.M., Einarsson, O.B., Gudjonsdottir, H.M., *et al.* (2003). The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet* 35, 131-138.
20. Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 4, 2881-2889.
21. Heubach, J.F., Ravens, U., Kaumann, A.J. (2004). Epinephrine activates both Gs and Gi pathways, but norepinephrine activates only the Gs pathway through human beta2-adrenoceptors overexpressed in mouse heart. *Mol Pharmacol* 65, 1313-1322.
22. Hjalmarson, A., Goldstein, S., Fagerberg, B., Wedel, H., Waagstein, F., Kjekshus, J., Wikstrand, J., El Allaf, D., Vitovec, J., Aldershvile, J., *et al.*, (2000). Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *Jama* 283, 1295-1302.

23. Ho, K.K., Pinsky, J.L., Kannel, W.B., Levy, D. (1993). The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22, 6A-13A.
24. Houslay, M.D., Baillie, G.S., Maurice, D.H. (2007). cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* 100, 950-966.
25. Iwase, M., Bishop, S.P., Uechi, M., Vatner, D.E., Shannon, R.P., Kudej, R.K., Wight, D.C., Wagner, T.E., Ishikawa, Y., Homcy, C.J., *et al.* (1996). Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circ Res* 78, 517-524.
26. Jo, S.H., Leblais, V., Wang, P.H., Crow, M.T., Xiao, R.P. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalizes the concurrent G(s) signaling during beta2-adrenergic stimulation. *Circ Res* 91, 46-53.
27. Kannel, W.B., Cupples, A. (1988). Epidemiology and risk profile of cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2 *Suppl* 1, 387-395.
28. Kaumann, A.J., Lemoine, H. (1987). Beta 2-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of adrenaline in human ventricular myocardium. Quantitative discrepancies with binding and adenylate cyclase stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335, 403-411.
29. Kerfant, B.G., Rose, R.A., Sun, H., Backx, P.H. (2006). Phosphoinositide 3-kinase gamma regulates cardiac contractility by locally controlling cyclic adenosine monophosphate levels. *Trends Cardiovasc Med* 16, 250-256.
30. Kerfant, B.G., Zhao, D., Lorenzen-Schmidt, I., Wilson, L.S., Cai, S., Chen, S.R., Maurice, D.H., Backx, P.H. (2007). PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res* 101, 400-408.
31. Kindermann, M., Maack, C., Schaller, S., Finkler, N., Schmidt, K.I., Laer, S., Wuttke, H., Schäfers, H.J., Böhm, M. (2004). Carvedilol but not metoprolol reduces beta-adrenergic responsiveness after complete elimination from plasma in vivo. *Circulation* 109, 3182-3190.
32. Leblais, V., Jo, S.H., Chakir, K., Maltsev, V., Zheng, M., Crow, M.T., Wang, W., Lakatta, E.G., Xiao, R.P. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase offsets cAMP-mediated positive inotropic effect via inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx in cardiomyocytes. *Circ Res* 95, 1183-1190.
33. Leroy, J., Abi-Gerges, A., Nikolaev, V.O., Richter, W., Lechene, P., Mazet, J.L., Conti, M., Fischmeister, R., Vandecasteele, G. (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* 102, 1091-1100.

34. Leroy, J., Richter, W., Mika, D., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Xie, M., Scheitrum, C., Lefebvre, F., Schittl, J., Mateo, P., *et al.* (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest* 121, 2651-2661.
35. Luo, J., McMullen, J.R., Sobkiw, C.L., Zhang, L., Dorfman, A.L., Sherwood, M.C., Logsdon, M.N., Horner, J.W., DePinho, R.A., Izumo, S., *et al.* (2005). Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* 25, 9491-9502.
36. Maack, C. (2012). Dissecting the role of g-protein-coupled receptor kinase 2 for excitation-contraction coupling. *Circulation* 125, 2054-2056.
37. Maack, C., Elter, T., Nickenig, G., LaRosee, K., Crivaro, M., Stablein, A., Wuttke, H., Böhm, M. (2001). Prospective crossover comparison of carvedilol and metoprolol in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 38, 939-946.
38. Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Conway, S.J., Bootman, M.D. (2004). The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *J Cell Sci* 117, 6327-6337.
39. Maier, U., Babich, A., Nürnberg, B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 274, 29311-29317.
40. McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., *et al.* (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33, 1787-1847.
41. McMurray, J.J., Stewart, S. (2000). Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83, 596-602.
42. Molina, C.E., Leroy, J., Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., Lee, I.O., Maack, C., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Verde, I., *et al.* (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 59, 2182-2190.
43. Mongillo, M., McSorley, T., Evellin, S., Sood, A., Lissandron, V., Terrin, A., Huston, E., Hannawacker, A., Lohse, M.J., Pozzan, T., *et al.* (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 95, 67-75.

44. Mühlhauser, U., Zolk, O., Rau, T., Munzel, F., Wieland, T., Eschenhagen, T. (2006). Atorvastatin desensitizes beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes via reduced isoprenylation of G-protein gamma-subunits. *Faseb J* 20, 785-787.
45. Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., Rockman, H.A. (2001). Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 276, 18953-18959.
46. Naga Prasad, S.V., Laporte, S.A., Chamberlain, D., Caron, M.G., Barak, L., Rockman, H.A. (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 158, 563-575.
47. Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Schmitteckert, E., Lohse, M.J., Engelhardt, S. (2006). Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 99, 1084-1091.
48. Oudit, G.Y., Kassiri, Z. (2007). Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7, 295-304.
49. Oudit, G.Y., Sun, H., Kerfant, B.G., Crackower, M.A., Penninger, J.M., Backx, P.H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37, 449-471.
50. Owan, T.E., Hodge, D.O., Herges, R.M., Jacobsen, S.J., Roger, V.L., Redfield, M.M. (2006). Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 355, 251-259.
51. Packer, M., Coats, A.J., Fowler, M.B., Katus, H.A., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J.L., Tendera, M., Castaigne, A., Roecker, E.B., *et al.* (2001). Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344, 1651-1658.
52. Packer, M., Fowler, M.B., Roecker, E.B., Coats, A.J., Katus, H.A., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J.L., Tendera, M., Staiger, C., *et al.* (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 106, 2194-2199.
53. Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., *et al.* (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387.

54. Perry, S.J., Baillie, G.S., Kohout, T.A., McPhee, I., Magiera, M.M., Ang, K.L., Miller, W.E., McLean, A.J., Conti, M., Houslay, M.D., *et al.* (2002). Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298, 834-836.
55. Poole-Wilson, P.A., Swedberg, K., Cleland, J.G., Di Lenarda, A., Hanrath, P., Komajda, M., Lubsen, J., Lutiger, B., Metra, M., Remme, W.J., *et al.* (2003). Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 362, 7-13.
56. Rao, Y.J., Xi, L. (2009). Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. *Acta Pharmacol Sin* 30, 1-24.
57. Remes, J., Reunanen, A., Aromaa, A., Pyorala, K. (1992). Incidence of heart failure in eastern Finland: a population-based surveillance study. *Eur Heart J* 13, 588-593.
58. Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M.D., Granier, S., Wang, Y.L., Rasmussen, S.G., Horner, K., Wang, P., Lei, T., *et al.* (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *Embo J* 27, 384-393.
59. Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., Krall, J., Movsesian, M.A., Conti, M. (2011). Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol* 106, 249-262.
60. Rochais, F., Abi-Gerges, A., Horner, K., Lefebvre, F., Cooper, D.M., Conti, M., Fischmeister, R., Vandecasteele, G. (2006). A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 98, 1081-1088.
61. Rockman, H.A., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415, 206-212.
62. Ruffolo, R.R., Jr. (1987). The pharmacology of dobutamine. *Am J Med Sci* 294, 244-248.
63. Schmechel, A., Grimm, M., El-Armouche, A., Hoppner, G., Schworer, A.P., Ehmke, H., Eschenhagen, T. (2009). Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects. *Cardiovasc Res* 82, 100-106.
64. Sette, C., Conti, M. (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J Biol Chem* 271, 16526-16534.

65. Waagstein, F., Bristow, M.R., Swedberg, K., Camerini, F., Fowler, M.B., Silver, M.A., Gilbert, E.M., Johnson, M.R., Goss, F.G., Hjalmarson, A. (1993). Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet* **342**, 1441-1446.
66. White, M., Yanowitz, F., Gilbert, E.M., Larrabee, P., O'Connell, J.B., Anderson, J.L., Renlund, D., Mealey, P., Abraham, W.T., Bristow, M.R. (1995). Role of beta-adrenergic receptor downregulation in the peak exercise response in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **76**, 1271-1276.
67. Xiao, R.P., Tomhave, E.D., Wang, D.J., Ji, X., Boluyt, M.O., Cheng, H., Lakatta, E.G., Koch, W.J. (1998). Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* **101**, 1273-1282.
68. Xiao, R.P., Zhu, W., Zheng, M., Chakir, K., Bond, R., Lakatta, E.G., and Cheng, H. (2004). Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 358-365.
69. Xie, P., Browning, D.D., Hay, N., Mackman, N., Ye, R.D. (2000). Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. *J Biol Chem* **275**, 24907-24914.
70. Zaccolo, M., Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-1715.
71. Zhu, W.Z., Wang, S.Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J.H., Devic, E., Kobilka, B.K., Cheng, H., Xiao, R.P. (2003). Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* **111**, 617-625.
72. Zhu, W.Z., Zheng, M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K., Xiao, R.P. (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1607-1612.

## 7. Publikationen/Dank

### Originalarbeiten

Molina, C.E., Leroy, J., Richter, W., Xie, M., Scheitrum, C., **Lee, I.O.**, Maack, C., Rucker-Martin, C., Donzeau-Gouge, P., Verde, I., *et al.* (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 59, 2182-2190.

**Lee, I.O.**, Kratz, M.T., Schirmer, S.H., Baumhäkel, M., and Böhm, M. (2012). The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 343, 253-257.

### Poster und Vorträge

Maack C, **Lee I-O**, Böhmer P, Zeller T, Dudenhöffer-Pfeifer M, Schmidt KI, Cremers B, Kilter H, Schäfers H-J, Böhm M (2007): Both  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors couple to phosphatidylinositol 3-kinase in human myocardium. *Winter Meeting on Translational Basic Science of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology*, Garmisch-Partenkirchen, Germany; 24-27 January 2007 (Posterpreis, 2. Platz)

**Lee I-O**, Zeller T, Böhmer P, Dudenhöffer-Pfeifer M, Hohl M, Kilter H, Schäfers HJ, Böhm M, Maack C: Der  $\beta$ 1-Adrenozeptor Polymorphismus Arg389Gly ist mit der Kopplung des Rezeptors an die Phosphatidylinositol-3 Kinase in menschlichem Myokard assoziiert. *Clin Res Cardiol* 2007: V717  
(Präsentation beim Jahreskongress der DGK in Mannheim)

**Lee I-O**, Böhmer P, Zeller T, Dudenhöffer-Pfeifer M, Hohl M, Kilter H, Schäfers HJ, Böhm M, Maack C (2007):  $\beta$ 1-Adrenergic Receptors are desensitized by a phosphatidylinositol-3 kinase mediated pathway in human myocardium. *Eur Heart J* 2007;28(Supplement): 873

Maack C, **Lee I-O**, Böhmer P, Dudenhöffer-Pfeifer M, Hohl M, Kilter H, Schäfers HJ, Böhm M (2007): Human cardiac beta1-adrenergic receptors are desensitized by receptor-mediated activation of phosphatidylinositol-3 kinase and phosphodiesterase-4. *Circulation* 2007; Abstract #763

**Lee I-O**, Hohl M, Wannemacher N, Böhmer P, Schäfers H-J, Böhm M, Maack C (2008): Kardiale  $\beta$ 1- adrenerge Rezeptoren werden durch sequenzielle Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase und der Phosphodiesterase 4 desensibilisiert. *Clin Res Cardiol* 2008;97(Suppl 1): P1236  
(Posterpräsentation beim Jahreskongress der DGK in Mannheim)

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack, der durch seine engagierte Betreuung und seine außerordentliche Fähigkeit, Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken, die hier vorliegende Arbeit erst möglich gemacht hat. Neben seinem professionellen Engagement möchte ich mich an dieser Stelle auch für seine freundschaftliche Betreuung bedanken.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm, der durch wissenschaftliche Diskussionen und das Aufbauen eines sanften aber nachhallenden Drucks die Erstellung dieser Arbeit vorangebracht hat.

Herrn Philip Böhmer und Kirsten Schiller danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und all die Hilfestellung, die ich während der Durchführung der Experimente benötigt habe.

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers und allen beteiligten Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes danke ich für die Hilfe und Kooperation, ohne die die Untersuchungen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Frau Dr. rer. nat. Tanja Zeller und Herrn Dr. rer. nat. Mathias Hohl möchte ich auch an dieser Stelle für die schöne und produktive Laborzeit danken. Durch ihre Expertise und Hilfestellung in der Molekularbiologie konnte auch dieser Teil der Arbeit zügig vorangebracht werden. Außerdem wurde durch Dr. Hohls berühmter-berühmter Kaffee so manche lange „Zappelnacht“ durchstanden.

Zuletzt möchte ich meiner ganzen Familie danken. Meinen Eltern, meiner Schwester und auch Schwiegereltern danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche menschliche, kulinarische und auch finanzielle Unterstützung.

Am meisten jedoch danke ich meiner lieben Frau.

## 8. Lebenslauf

**Name:** Illkyu-Oliver Lee  
**Geburtstag/-ort:** 26.01.1982 in Düsseldorf  
**Nationalität:** deutsch  
**Stand:** verheiratet mit Ulrike Johanna Lee, geb. Passek  
**Religion:** römisch katholisch  
**Eltern:** Chang-No Lee  
Gui-Mae Chang  
**Geschwister:** Mihee Lee-Döring, geb. Lee

### Schulbildung:

1992 – 1993: Luisen Gymnasium, Düsseldorf  
1993 – 2001 St. Ursula Gymnasium, Düsseldorf  
07/1998 – 01/1999 Washington Community High School, Illinois, USA

### Universitätslaufbahn:

Seit 10/2002 Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Studium der Humanmedizin  
08/2004 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)  
07/2005 – 03/2006 Universität de Valencia, Spanien  
Studienintegriertes Auslandssemester im Rahmen des ERASMUS/Socrates Programms  
04-05/2009 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Seit August 2009 Facharztausbildung am  
Universitätsklinikum des Saarlandes,  
Klinik für Innere Medizin III,  
Kardiologie, Angiologie und  
internistische Intensivmedizin  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Böhm)

