

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)**

**Molekulare Grundlagen für die Regulation der Kontraktilität
im gesunden und kranken Herzen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
eines habilitierten Doktors der Medizinischen Wissenschaften (Dr. rer. medic. habil.)
für das Fachgebiet Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. rer. nat. Ulrich Kurt Gergs
geboren am 26.06.1966 in Herten

Gutachter/Gutachterin:

Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann

Prof. Dr. med. Stefan Engelhardt

Fakultätsöffentliche Vorlesung: 21.11.2019

Fakultätsöffentliche Verteidigung: 17.12.2019

REFERAT

Zielsetzung: Ziel war es, die Wirkung und Signaltransduktion von Serotonin (5-HT), ATP und Adenosin auf die Funktion des Herzens zu untersuchen. Bei der Signaltransduktion wurde der Schwerpunkt auf die Funktion der Proteinphosphatasen PP2A und PP1 gelegt, die auch an der Regulation der Funktion von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen wie Junctin beteiligt sind. Störungen an verschiedenen Stellen dieser Signalwege könnten zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz führen.

Methoden: Die Untersuchungen fanden an isolierten Herzmuskelpräparaten des Menschen sowie an transgenen Mäusen mit kardialer PP2A-, PP1-, I-2-, oder 5-HT₄-Rezeptor-Überexpression statt. Eine Junctin-Überexpression in Herzmuskelzellen wurde mittels Adenoviren erzeugt.

Ergebnisse: Im rechten Vorhof des Menschen übte 5-HT einen positiv inotropen und lusitropen Effekt über 5-HT₄-Rezeptoren aus. Überexpression des 5-HT₄-Rezeptors in transgenen Mäusen führte nur bei transgenen aber nicht bei Wildtyp-Mausherzen zu einem positiv inotropen und chronotropen Effekt von 5-HT. Die Gabe von ATP führte am menschlichen Vorhof zu einem transienten negativen gefolgt von einem positiv inotropen Effekt. Eventuell ist ein P_{2X4}-ähnlicher Rezeptor beteiligt. Adenosin kann über A₁-Rezeptoren negativ inotrope Effekte am menschlichen Vorhof ausüben. Hier aber wurde bei etwa 25% der untersuchten Patienten ein positiv inotroper Effekt gemessen. Die Überexpression von PP2A oder PP1 im Mausherz verminderte den Phosphorylierungszustand verschiedener regulatorischer Proteine und bewirkte eine Herzhypertrophie, eine ventrikuläre Dilatation und eine verminderte kardiale Kontraktilität. Bei PP1-Mäusen konnte eine I-2-Überexpression die negativen Effekte der PP1-Überexpression unterdrücken. Die adenovirale Überexpression von Junctin in Kardiomyozyten führte zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase.

Schlußfolgerungen: Die Effekte von 5-HT in rechten Vorhöfen des Menschen sind über 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt und können an einem transgenen Mausmodell nachvollzogen werden. ATP hat einen biphasischen inotropen Effekt und könnte möglicherweise nach einer Schädigung des Arbeitsmyokards die Kontraktilität zum Teil aufrechterhalten. Adenosin kann zumindest bei einigen Patienten zu einem bisher nicht bemerkten positiv inotropen Effekt führen. Die Befunde an PP-Mäusen deuten auf eine wichtige Rolle der Proteinphosphatasen für die Funktion des Herzens hin. Somit könnten PP-Hemmstoffe neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung der Symptome einer Herzinsuffizienz darstellen. Die Herabregulation Ca^{2+} -regulatorischer Proteine wie Junctin bei der menschlichen Herzinsuffizienz könnte einen kompensatorischen Mechanismus im Herzen darstellen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Serotonin	3
1.2. ATP	5
1.3. Adenosin	7
1.4. Proteinphosphatasen	8
1.5. Calcium-Homöostase	11
2. ZIELSTELLUNG	13
3. ANGEWANDTE METHODEN	15
3.1. Menschliches Herzgewebe	15
3.2. Transgene Mäuse	15
3.3. Rekombinante Adenoviren	15
3.4. Isolierte Rattenkardiomyozyten	16
3.5. Isolierte Mauskardiomyozyten	16
3.5.1. Ca²⁺-Transienten	16
3.5.2. Zellverkürzung	16
3.5.3. L-Typ-Ca²⁺-Ströme	16
3.6. Northern-Blot-Analyse und RT-PCR	17
3.7. Nachweis von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und cAMP	17
3.8. Nachweis von Tryptophan, Serotonin und Katecholaminen	17
3.9. Western-Blot-Analysen	17
3.10. Proteinphosphatase-Messungen	17
3.11. Histologie und Immunzytochemie	18
3.12. Echokardiographie	18
3.13. Invasive Hämodynamik	18
3.14. Aktionspotentiale am isolierten Herzen	18
3.15. Kontraktionskraftmessungen an isolierten Vorhofpräparaten	18
3.16. Kontraktionskraftmessungen an isolierten Ventrikeln	19
3.17. Datenanalyse	19
4. LISTE DER ORIGINALARBEITEN	20
5. ZUSAMMENFASSUNG DER EIGENEN ARBEITEN	22

5.1.	Serotonin	23
5.2.	ATP	26
5.3.	Adenosin	30
5.4.	PP2A	33
5.5.	PP1 und I-2	37
5.6.	Ca²⁺-Homöostase	40
6.	AUSBLICK	45
7.	ZUSAMMENFASSUNG	46
8.	LITERATUR	49
9.	THESEN	69
10.	ANHANG	
	<i>Selbständigkeitserklärung</i>	III
	<i>Erklärung über frühere Habilitationsversuche</i>	IV
	<i>Lebenslauf</i>	V
	<i>Danksagung</i>	VI
	ORIGINALARBEITEN ZUR HABILITATIONSSCHRIFT	

1. EINLEITUNG

Die Kontraktilität von Herzmuskelzellen kann u.a. durch β -adrenerge Stimulation beeinflusst werden. Die Aktivierung von kardialen β -Rezeptoren durch endogene oder exogene Agonisten führt über stimulatorische G-Proteine zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase. Diese katalysiert die Bildung von cAMP, was in einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) mündet. Bei der nachfolgenden Reizweiterleitung spielt die reversible Phosphorylierung regulatorischer Proteine durch die PKA und andere Proteinkinasen und deren Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen eine wichtige Rolle. Jede Veränderung im Phosphorylierungsmuster der regulatorischen Proteine kann deren Funktion verändern, was Auswirkungen auf die gesamte Herzmuskelzelle haben kann. Beispielsweise können Zellstoffwechsel, Transkription und Translation von Genen, sowie die Funktion der Myofilamente und die Ca^{2+} -Homöostase über Proteinphosphorylierungen reguliert werden, was sich z.B. in einer veränderten Kraftentwicklung der Herzmuskelzelle äußert (positiv inotroper Effekt der β -adrenergen Stimulation). Der β -adrenerge Signalweg ist wiederum mit anderen Signalwegen vernetzt. So kann der cAMP-Gehalt auch über die Aktivierung von Serotoninrezeptoren erhöht werden, was vergleichbare Effekte zur Folge hat. Adenosin dagegen kann über Adenosinrezeptoren den cAMP-Anstieg verhindern oder die Aktivität von Phosphatasen erhöhen und auch extrazelluläres ATP kann über sarkolemmale Rezeptoren die Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen. In **Abbildung 1** sind diese Zusammenhänge schematisch vereinfacht dargestellt. Über dieses Signalnetzwerk wird letztlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) der Kardiomyozyten sowie die Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR erhöht oder vermindert, was z.B. zu veränderten inotropen, lusitropen und chronotropen Effekten führt. Je nach Art der Stimulation können diese Veränderungen sowohl positiv wie negativ sein.

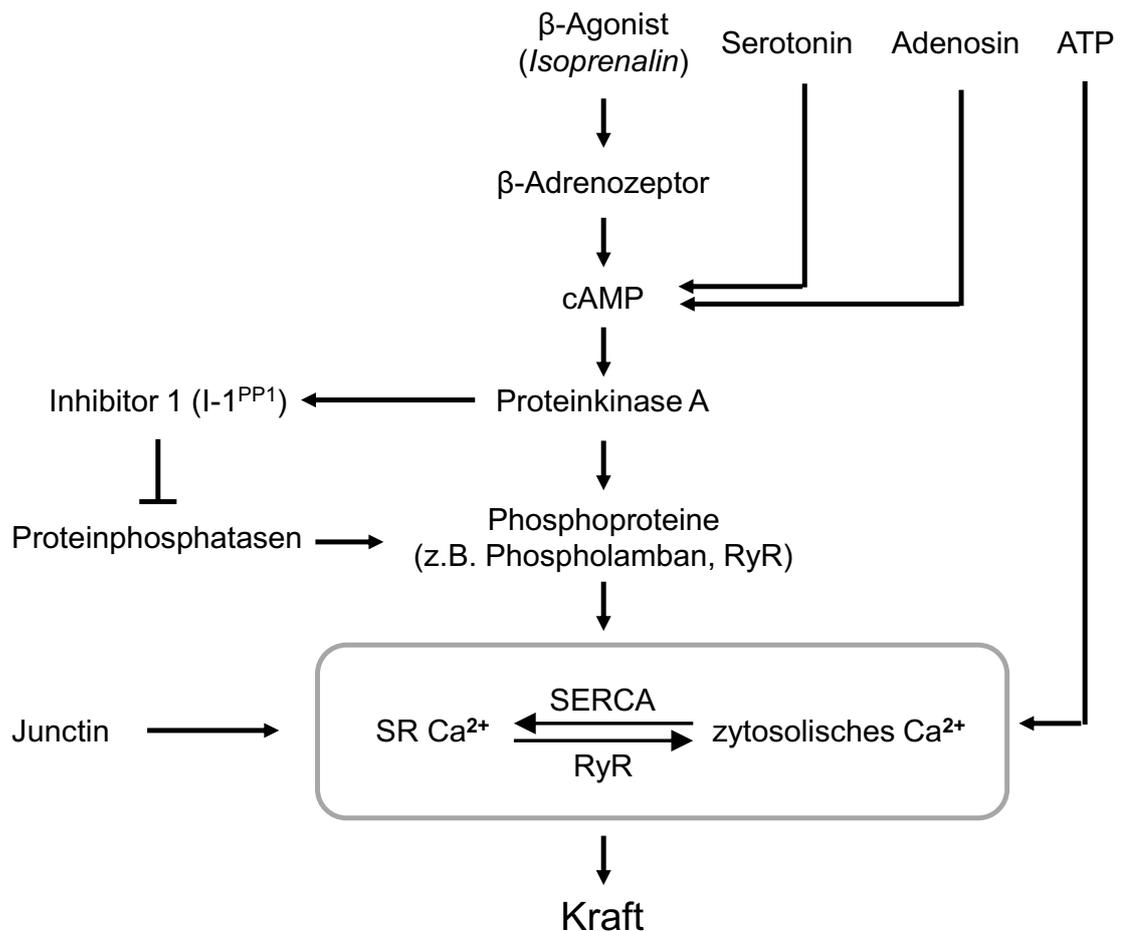


Abbildung 1: Schematische Darstellung des β -adrenergen Signalweges und dessen Beeinflussung durch andere Signalwege.

cAMP, zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat; RyR, Ryanodinrezeptor (Ca^{2+} -Freisetzungskanal); SR, sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase; ATP, Adenosintriphosphat.

Neben dem reversiblen Regulationsmechanismus der Proteinphosphorylierung kann die Ca^{2+} -Homöostase aber auch durch eine veränderte Expression regulatorischer SR-Proteine dauerhaft verändert werden. Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. Hypertonie oder Ischämie, kann es zu einer übermäßigen Freisetzung verschiedener Mediatoren kommen. Eine dauerhafte Stimulation der entsprechenden Rezeptoren würde dann zu Veränderungen der Funktion (z.B. Phosphorylierung) oder auch der veränderten Expression regulatorischer Proteine führen. Derartige Veränderungen können kurzfristig die Kontraktilität des Herzens erhalten, aber langfristig z.B. durch Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase und des Zellstoffwechsels zu einer Herzhypertrophie und/oder Herzinsuffizienz führen. In **Abbildung 2** wird schematisch

das Zusammenwirken der verschiedenen Signalwege, die in den hier vorgestellten wissenschaftlichen Arbeiten näher untersucht wurden, etwas detaillierter dargestellt. Im Folgenden werden die untersuchten Teilbereiche genauer vorgestellt.

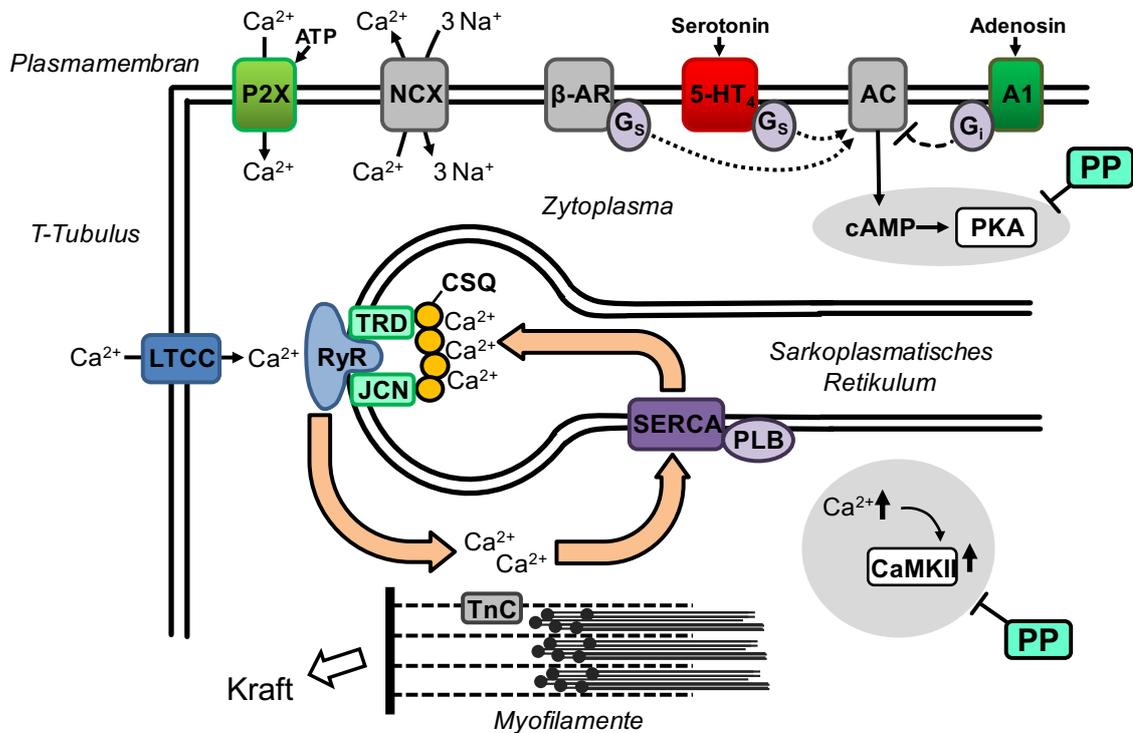


Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Signalwege, welche die Funktion einer Herzmuskelzelle beeinflussen.

5-HT₄, Serotoninrezeptor Typ 4; A1, Adenosinrezeptor Typ 1; AC, Adenylylzyklase; beta-AR, beta-Adrenozeptor; CaMKII, Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase Typ II; CSQ, Calsequestrin; G_i, inhibitorisches G-Protein; G_s, stimulatorisches G-Protein; JCN, Junctin; LTCC, L-Typ Ca²⁺-Kanal; NCX, Na⁺/Ca²⁺-Austauscher; P2X, Purinrezeptor Typ 2X; PKA, Proteinkinase A; PLB, Phospholamban; PP, Proteinphosphatase; RyR, Ryanodinrezeptor (Ca²⁺-Freisetzungskanal); SERCA, sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase; TnC, Ca²⁺-bindende Untereinheit des Troponins; TRD, Triadin.

1.1. Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamine: 5-HT) ist für zahlreiche Effekte im ZNS und im kardiovaskulären System von Bedeutung. Die Synthese von Serotonin erfolgt hauptsächlich in enterochromaffinen Zellen des Darms und des ZNS (Verbeuren 1990, 1992; Yusuf et al. 2003). Serotonin wird von diesen Zellen freigesetzt und dann sehr schnell von Thrombozyten aufgenommen und gespeichert. Das von Thrombozyten nach deren Aktivierung freigesetzte Serotonin scheint hauptsächlich für 5-HT-Wirkungen auf

das kardiovaskuläre System verantwortlich zu sein. Hierzu zählen z.B. Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation, Apoptose kardialer Zellen, Steigerung der Herzfrequenz, Arrhythmogenese (Kaumann 1994; Kaumann und Sanders 1994), sowie positiv inotrope und relaxierende Effekte (Übersicht bei Kaumann und Levy 2006). Interessanterweise sind die inotropen Effekte von Serotonin am Herzen regional verschieden. In isolierten Vorhofpräparaten von Schweinen, Meerschweinchen, Ratten und Menschen induzierte Serotonin einen positiv inotropen Effekt (Docherty 1988; Kaumann 1994; Kaumann et al. 1990; Læer et al. 1998a,b; Tramontana et al. 1993). An ventrikulären Präparaten des Menschen konnte ein inotroper Effekt von Serotonin erst nach Phosphodiesterase (PDE)-Hemmung nachgewiesen werden (Brattelid et al. 2004b). Zurzeit werden sieben Gruppen von Serotonin-Rezeptoren unterschieden (5-HT₁₋₇; Hoyer et al. 1994, 2002; Kaumann und Levy 2006). Abgesehen von dem 5-HT₃-Rezeptor gehören alle Serotoninrezeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. 5-HT₂-Rezeptoren stimulieren G-Protein-vermittelt die Aktivität der Phospholipase C, während 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren die Adenylylzyklase aktivieren (Hoyer et al. 1994, 2002). 5-HT₁- und 5-HT₅-Rezeptoren hemmen die Adenylylzyklaseaktivität (Hoyer et al. 1994). 5-HT₃-Rezeptoren aktivieren Ionenkanäle direkt ohne Beteiligung einer Signalweiterleitung über z.B. sekundäre Botenstoffe. Speziesabhängig kann der positiv inotrope Effekt von Serotonin durch verschiedene Rezeptoren vermittelt sein. In der Ratte sind 5-HT_{2A}-Rezeptoren für den positiv inotropen Effekt verantwortlich (Læer et al. 1998a,b), im Meerschweinchen aber 5-HT₃-Rezeptoren (Tramontana et al. 1993). Beim Menschen vermitteln 5-HT₄-Rezeptoren den positiv inotropen Effekt (Kaumann et al. 1990, 1991). Diese Schlußfolgerungen basierten ursprünglich auf klassischen pharmakologischen Experimenten, bei denen rezeptorselektive Agonisten und Antagonisten verwendet wurden. Später konnten im menschlichen Vorhof und Ventrikel die mRNAs verschiedener Spleißvarianten von 5-HT₄-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bach et al. 2001; Blondel et al. 1998; Brattelid et al. 2004a). Mittels PCR fand man im Herzen verschiedene Serotoninrezeptoren, von denen jeder Rezeptor eine spezielle Funktion haben könnte. So konnten beispielsweise im Rattenherz mRNAs von 5-HT_{2A}- und 5-HT₄-Rezeptoren nachgewiesen werden. Jedoch wird der positiv inotrope Effekt von Serotonin im Rattenvorhof nur über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt und nicht über 5-HT₄-Rezeptoren (Læer et al. 1998a,b; Qvigstad et al. 2005b). Außerdem war der Einfluß von Serotonin auf die Inotropie in diesem Tiermodell unterschiedlich zwischen Vorhof

und Ventrikel. So war die mRNA für den 5-HT_{2A}-Rezeptor sowohl im Vorhof wie im Ventrikel der Ratte nachweisbar, aber Serotonin erhöhte die Kontraktionskraft nur im Rattenvorhof und nicht im Ventrikel (Läer et al. 1998a,b; Qvigstad et al. 2005a). Die Situation änderte sich, wenn z. B. bei der Ratte durch Ligation der Koronararterie eine Herzinsuffizienz experimentell induziert wurde: es kam dann zu einer verstärkten Expression der 5-HT₄-Rezeptor-mRNA und dieser neu exprimierte Rezeptor vermittelte nun den positiv inotropen Effekt von Serotonin im Ventrikel (Qvigstad et al. 2005a). Der Vorhof wurde in dieser Studie nicht untersucht. In Präparationen vom menschlichen rechten Vorhof erhöhte Serotonin nicht nur die Kontraktionskraft, sondern führte auch zu einem Anstieg des cAMPs und der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Kaumann et al. 1990, 1991). In diesen Arbeiten spekulierten die Autoren, der positiv inotrope Effekt von Serotonin basiere auf der Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) und der inhibitorischen Untereinheit von Troponin (TnI) (Kaumann et al. 1990, 1991). Diese Annahme war naheliegend, da PLB durch Phosphorylierung seine hemmende Wirkung auf die Calciumpumpe des SR verliert. Die Phosphorylierung von TnI führt zu einer Desensitivierung der kontraktilen Proteine für Ca²⁺ und beschleunigt somit die Relaxation. Außerdem erhöht eine β-adrenerge Stimulation die Phosphorylierung von PLB und TnI im Herzen, auch in isolierten ventrikulären Trabekeln des Menschen (Bartel et al. 1996).

1.2. ATP

Kurz nach der Entdeckung von ATP (Lohmann 1929) haben Drury und Szent-Györgyi (1929) von kardialen Effekten dieser Substanz und seinen Abbauprodukten AMP und Adenosin berichtet. Nach i.v.-Injektion dieser Substanzen wurden bei Hunden und Katzen negativ chronotrope Effekte und eine Abnahme des Blutdrucks gefunden. Später hat Berne (1963) Nukleotidderivate in Perfusaten von hypoxischen Herzen nachgewiesen und vorgeschlagen, die vasodilatorischen Effekte von ATP könnten durch dessen Abbauprodukt Adenosin vermittelt sein. Dies führte zu Studien über Adenosineffekte im kardiovaskulären System. Das Interesse am ATP selbst kam erst später wieder auf. Unter anderem durch die Annahme, ATP sei ein Kotransmitter in nicht-adrenergen und nicht-cholineren Neuronen (Burnstock et al. 1970). So kann ATP von Nervenendigungen als Kotransmitter zusammen mit Noradrenalin und Acetylcholin freigesetzt werden (Burnstock 1972). Extrazelluläres ATP kann zahlreiche Effekte im kardiovaskulären System bedingen. Dazu gehören in Abhängigkeit von der Spezies

negativ und positiv inotrope Effekte, negativ chronotrope und negativ dromotrope sowie antihypertrophe Effekte (Vassort 2001). Außerdem wurden noch andere physiologische Effekte von ATP im Herzen nachgewiesen, wie eine Hemmung des Glukosetransportes und eine Beeinflussung der ischämischen Präkonditionierung (Fischer et al. 1999; Ninomiya et al. 2002). Große Mengen von ATP können aus der Herzmuskelzelle selbst bei Ischämie freigesetzt werden, aber auch von aktivierten Plättchen (Berne 1963; Day und Holmsen 1971). Normalerweise sind im Koronarsystem sehr niedrige ATP-Konzentrationen (1 nM: Borst und Schrader 1991) anzutreffen, weil ATP sehr schnell durch lösliche und membrangebundene ATPasen zu ADP, AMP und Adenosin abgebaut wird (Jorgensen 1956; Welford et al. 1987). Jedoch können im Interstitium des Herzens bei Ischämie auch höhere Konzentrationen von ATP im Bereich von 40 nM gemessen werden (Kuzmin et al. 1998). Prinzipiell kann ATP über P1- und P2-Purinozeptoren wirken (Burnstock und Meghji 1981). An P1-Rezeptoren ist Adenosin jedoch viel potenter als ATP als Agonist wirksam, an P2-Rezeptoren verhält es sich genau umgekehrt. P2-Rezeptoren werden weiter unterteilt in P2X- und P2Y-Rezeptoren (Fredholm et al. 1994). Am isolierten elektrisch gereizten linken Vorhof der Ratte wurde ein initial negativ inotroper Effekt von ATP gefunden, der gefolgt wurde von einem positiv inotropen Effekt. Dieser positiv inotrope Effekt wurde sowohl durch Suramin wie auch durch Reactive Blue 2 antagonisiert und war somit P2-Rezeptor vermittelt (Froldi et al. 1994; Mantelli et al. 1993). Dagegen war der initiale negativ inotrope Effekt von ATP an Ratten- und Meerschweinchenvorhöfen P1-Rezeptor vermittelt, da er durch 1,3-Dipropylcyclopentylxanthin (DPCPX), einem selektiven Hemmstoff des A₁-Rezeptorsubtypes des P1-Rezeptors gehemmt wurde (Froldi et al. 1994; Mantelli et al. 1993). An isolierten Ratten-Kardiomyozyten und isoliert perfundierten Herzen von Ratte und Maus bewirkte der P2X-Rezeptoragonist 2-Methylthio-ATP einen positiv inotropen Effekt (Mei und Liang 2001), was zuvor auch schon an isolierten Hühner- und Mauskardiomyozyten gezeigt wurde (Podrasky et al. 1997). Im Ventrikel der Ratte wurde nie ein negativ inotroper Effekt von ATP beobachtet, dafür aber ein kleiner positiv inotroper Effekt (Legssyer et al. 1988; Puceat et al. 1993). Dies war von einem verstärkten L-Typ-Ca²⁺-Strom begleitet und folglich mit einem Anstieg des freien intrazellulären Ca²⁺, was zu einer erhöhten Kontraktilität führte (Hirano et al. 1991; Scamps et al. 1990). ATP bewirkt keine Ca²⁺-Sensitivierung der Myofilamente, kann aber den pH-Wert des Zytosols erhöhen, was zu dem positiv inotropen Effekt beitragen könnte (Fabiato und Fabiato 1978; Puceat et al. 1993).

Klinisch wird ATP zur Behandlung von supraventrikulären Arrhythmien, insbesondere bei Kindern, eingesetzt. Da ATP sehr schnell zu Adenosin abgebaut wird, wurde vermutet, die Blockade des AV-Knotens bei den Patienten bewirke das durch den Metabolismus von ATP entstandene Adenosin über Aktivierung von A₁-Adenosinrezeptoren. Dies führte zu einer Vagusaktivierung ohne Beteiligung von P₂-Rezeptoren (Saito et al. 1986). Inotrope Effekte von ATP am menschlichen Herzen – Vorhof oder Ventrikel – sind bisher nicht beschrieben worden.

1.3. Adenosin

Adenosin vermittelt zahlreiche Effekte im menschlichen Körper. Einige der Effekte und Signalwege von Adenosin sind identisch oder ähnlich einer Vagusstimulation. Zum Beispiel hat Adenosin einen negativ chronotropen Effekt am Sinusknoten, einen negativ dromotropen Effekt am AV-Knoten und einen negativ inotropen Effekt am Vorhof (Drury und Szent-Györgyi, 1929; Übersicht: Shryock und Belardinelli 1997). Adenosin kann über vier verschiedene Rezeptortypen, A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, wirken. Stimulation von A₁- und A₂-Adenosinrezeptoren wurde ursprünglich mit einer Hemmung oder Stimulation der Adenylylzyklase in Verbindung gebracht. Diese Untersuchungen fanden an zahlreichen Zelltypen statt (Ramkumar et al. 1988; Olsson und Pearson 1990). So wurde der negativ inotrope Effekt von Adenosin am Vorhof der Ratte mit einer Hemmung der Adenylylzyklase und einer Abnahme des cAMP-Gehalts in Verbindung gebracht (Linden et al. 1985). Andere Arbeitsgruppen konnten keine Abnahme des cAMPs finden (Meerschweinchen: Böhm et al. 1986; Brückner et al. 1985; Kurachi et al. 1986). Der negativ inotrope Effekt von Adenosin am Vorhof konnte durch Pertussistoxin blockiert werden (Böhm et al. 1986; Endoh et al. 1983) und war somit durch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine vermittelt, sowie wahrscheinlich teilweise auch durch eine erhöhte K⁺-Leitfähigkeit des Sarkolemmas bedingt (Belardinelli und Isenberg 1983). Jedoch könnte auch die Stimulation einer Proteinphosphataseaktivität (PP1 und/oder PP2A) an den beobachteten negativ inotropen Effekten von Adenosin beteiligt sein (Gupta et al. 1993a, b; Liu und Hofmann 2003). Im Ventrikel der meisten Spezies hat Adenosin allein praktisch keine Auswirkungen auf die Kontraktionskraft, kann aber eine β-adrenerge Stimulation antagonisieren. Etwas allgemeiner ausgedrückt antagonisiert Adenosin die inotropen Effekte von cAMP-erhöhenden Substanzen, einschließlich Forskolin und Phosphodiesterase-Hemmern (Dobson 1978, 1983; Brückner et al. 1985, Böhm et al.

1984). Keinen Einfluß hat Adenosin allerdings auf den positiv inotropen Effekt von Substanzen, die unabhängig vom cAMP wirken, wie z.B. α -Adrenozeptoragonisten, Herzglykoside oder erhöhtes extrazelluläres Ca^{2+} . Zusätzlich kann Adenosin über präsynaptische Rezeptoren die Noradrenalinfreisetzung aus Nervenendigungen fördern und Adenosin kann relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur wirken. Adenosin wird unter anderem in Herzmuskelzellen synthetisiert, aus denen es während einer β -adrenergen Stimulation, einer Ischämie oder einer Nekrose über sarkolemmale Transporter freigesetzt werden kann (Burnstock und Pelleg 2015). Klinisch haben Adenosin und sein Vorläufer ATP einen Nutzen bei der Behandlung supraventrikulärer Arrhythmien (Burnstock 2017). Somit ist die Wirkung von Adenosin auf den menschlichen Vorhof von klinischer Bedeutung und verdient weitere Untersuchungen.

1.4. Proteinphosphatasen

Die reversible Proteinphosphorylierung ist ein wesentlicher regulatorischer Mechanismus für zahlreiche zelluläre Funktionen einschließlich der Ca^{2+} -Homöostase. Proteinphosphatasen können in der Zelle genauso effizient reguliert werden wie dies für Proteinkinasen bekannt ist und Abweichungen in der Funktion der Proteinphosphatasen können zu Krankheiten des Menschen führen oder beitragen (Janssens und Goris 2001; Übersicht: Köhn 2017). Die meisten Proteinphosphatasen im Herzen sind Serin/Threoninphosphatasen (Überblick in: Shi 2009, Herzig und Neumann 2000; Hood et al. 2017; Heijman et al. 2017), die im Wesentlichen in die Gruppen PP1, PP2A, -2B und -2C eingeteilt werden (Nairn und Shenolikar 1992; Chen et al. 2017). Die Hauptphosphataseaktivität im Herzen konnte den katalytischen Untereinheiten von PP1 und PP2A zugeordnet werden (Lubbers und Mohler 2016).

PP1-Enzyme sind heteromere Komplexe bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (PP1c) und regulatorischen Proteinen, die u. a. für die Substratspezifität und subzelluläre Lokalisation verantwortlich sind (Ceulemans et al. 2002, Cohen 2002, DePaoli-Roach 2003, St-Denis et al. 2016). Für die katalytische Untereinheit der PP1 (PP1c) konnten bis jetzt mehr als ein Duzend bindende und regulatorische Proteine identifiziert werden (Shi 2009, Herzig und Neumann 2000; Knight et al. 2017). Die Aktivität der PP1, nicht aber der PP2A, wird durch die hitzestabilen Proteine Inhibitor-1 (I-1) und Inhibitor-2 (I-2) gehemmt (Brandt et al. 1975, Holmes et al. 1986, Huang und Glinsmann 1976, Roach et al. 1985). Beide Inhibitoren werden im Herzen exprimiert. Während I-2 im nicht phosphorylierten Zustand die PP1 hemmt, muß I-1 an Threonin-

35 durch die PKA phosphoryliert werden, um seine inhibitorische Aktivität zu erlangen. Nach β -adrenerger Stimulation erfolgt diese Phosphorylierung sehr schnell (Foulkes und Cohen 1979, Gupta et al. 1996, Neumann et al. 1991).

Die typischerweise trimeren Holoenzyme der PP2A enthalten als Kernstruktur eine 36 kDa große katalytische Untereinheit (PP2Ac) und eine 65 kDa großen regulatorischen Untereinheit, PR65 oder A-Untereinheit genannt. Mit dieser Kernstruktur kann eine dritte Untereinheit, eine sogenannte B-Untereinheit, verbunden sein (Virshup 2000), um das trimere Holoenzym zu bilden (Chen et al. 2017). Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten in Säugern zwei Isoformen, α und β , der PP2Ac nachgewiesen werden, deren primäre Sequenzen zu 97% identisch sind (Chen et al. 2017). Beide Isoformen wurden im Herzen in größeren Mengen nachgewiesen (Übersicht: Herzig und Neumann 2000). Jedoch ist die PP2Ac α -Form etwa zehnmals häufiger als die PP2Ac β -Form, was eventuell an einem aktiveren Genpromoter liegen könnte (Janssens und Goris 2001). Die beiden Isoformen werden von verschiedenen Genen kodiert (Chen et al. 2017). PP2A ist im Laufe der Evolution weitgehend unverändert erhalten geblieben und könnte somit das am stärksten konservierte Protein sein (Janssens und Goris 2001; Chen et al. 2017). Die B-Untereinheiten vermitteln die subzelluläre Lokalisation, die entwicklungsabhängige Regulation und die Zellspezifität des PP2A-Holoenzym. Die A-Untereinheit stellt eine strukturelle Untereinheit dar, welche fest mit der PP2Ac assoziiert ist und eine Grundstruktur bildet, an die entsprechende B-Untereinheiten binden können (Shi 2009, Janssens und Goris 2001, Herzig und Neumann 2000).

Eine β -Adrenozeptor-Stimulation führt zur Bildung von cAMP und nachfolgend zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Kranias und Hajjar 2012). Über diesen Weg erhöhen β -Adrenozeptoragonisten die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR in dem unter anderem der Ca^{2+} -Einstrom über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal stimuliert wird. Die Relaxation des Muskels wird wesentlich durch die SERCA vermittelt (Kranias und Hajjar 2012). β -Adrenozeptoragonisten erhöhen die Aktivität von SERCA auf eine indirekte Weise. Eine verstärkte Phosphorylierung von Phospholamban (PLB), einem intrinsischen Membranprotein des kardialen SR, vermindert dessen hemmende Wirkung auf SERCA und mehr Ca^{2+} wird aus dem Zytosol in das SR gepumpt (Kranias und Hajjar 2012). In der folgenden Systole kann mehr Ca^{2+} aus den gefüllten SR-Speichern freigesetzt werden und mehr Kraft wird erzeugt. Somit trägt die PLB-Phosphorylierung

wesentlich zu den positiv inotropen und relaxierenden Effekten einer β -adrenergen Stimulation im Herzen bei (Ginsburg und Bers 2004, Wallukat 2002, Simmerman und Jones 1998, Sulakhe und Vo 1995). Durch Proteinphosphatasen wird dieser Prozeß umgekehrt.

Eine erhöhte Phosphataseaktivität im Herzen kann zu kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz beitragen. Sowohl bei der menschlichen Herzinsuffizienz als auch bei experimentellen Tiermodellen der Herzinsuffizienz ist die PP1-Aktivität signifikant erhöht (El-Armouche et al. 2007, Gupta et al. 2003, Neumann et al. 1997). In explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz wurden erhöhte PP1c-mRNA-Spiegel sowie eine erhöhte PP1-Aktivität gefunden (Mishra et al. 2002, Neumann et al. 1997). Dieser Anstieg dürfte zu der verminderten kardialen Funktion, der Kardiomyopathie und dem Tod in diesem Tiermodell beitragen (Carr et al. 2002, Neumann et al. 1998). Damit übereinstimmend wurde eine reduzierte Phosphorylierung von kardialen regulatorischen Proteinen, wie PLB und TnI, in Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz nachgewiesen (Bartel et al. 1996, Bodor et al. 1997, Carr et al. 2002, Mishra et al. 2002, Schwinger et al. 1999). Ein Kausalzusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und PP1 wurde in Tiermodellen mit chronischer β -adrenerger Stimulation durch Infusion von Isoprenalin gezeigt. Dabei kam es zu kardialer Hypertrophie, erhöhter Proteinphosphataseaktivität, verminderter Expression des PP1-Inhibitors I-1 und zur PLB-Dephosphorylierung (El-Armouche et al. 2007, Boknik et al. 2000). Dieses Modell der kardialen Dysfunktion ist durchaus klinisch relevant, da eine verminderte β -adrenerge Stimulation ein wesentliches Kennzeichen der menschlichen Herzinsuffizienz ist (Bristow et al. 1982) und viele Patienten mit Herzinsuffizienz können erfolgreich mit β -Adrenozeptor-Antagonisten behandelt werden (Übersicht in: Metra und Teerlink 2017).

Die herzspezifische Überexpression von PP1c in Mäusen mit einem Expressionsniveau, das dem entsprach, was bei der menschlichen Herzinsuffizienz beobachtet wurde, bewirkte eine Dephosphorylierung von PLB, eine stark abgeschwächte basale und β -adrenerg stimulierte Herzfunktion, eine dilatative Kardiomyopathie und einen vorzeitigen Tod (Carr et al. 2002, Neumann et al. 1998). Umgekehrt verbesserte die herzspezifische Überexpression von trunkierten, funktionell aktiven Formen von I-2 oder I-1 die Herzfunktion (Kirchhefer et al. 2005, Pathak et al. 2005). Auch die PP2A kann offensichtlich negative Auswirkungen auf die Herzfunktion haben: so konnte

Fostriecin, ein PP2A-Hemmstoff, die Infarktgröße in Kaninchenherzen reduzieren (Hastie und Cohen 1998, Weinbrenner et al. 1998).

1.5. Ca^{2+} -Homöostase

Ca^{2+} hat eine Schlüsselfunktion für die Regulation der Kopplung von Erregung und Kontraktion im Herzen. Nach Depolarisation der Herzmuskelzellmembran gelangt Ca^{2+} über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal in die Herzmuskelzelle und bewirkt dort über Aktivierung von Ca^{2+} -Freisetzungskanälen, den sogenannten Ryanodinrezeptoren (RyR), die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Übersicht in: Ljubojevic und Bers 2015). Dieser Prozeß wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet (Fabiato und Fabiato 1978; Haghghi et al. 2014; Bers 2014). Der resultierende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration initiiert die Muskelkontraktion (Bers 2002, 2000). Für die Relaxation der Herzmuskelzelle muß das Ca^{2+} aus dem Zytosol entfernt werden. Dies geschieht zum einen über die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und zum anderen über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) im Sarkolemma. Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase scheinen eine wesentliche Rolle für die kontraktile Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz zu spielen. Mindestens drei Mechanismen können zu einem verminderten SR- Ca^{2+} -Gehalt beitragen, was zu einer kontraktile Dysfunktion führt. Dies sind eine verminderte SERCA-Aktivität, wodurch weniger Ca^{2+} in das SR gepumpt wird, eine erhöhte NCX-Funktion, was zu einem Ca^{2+} -Verlust über die Plasmamembran führt und ein vermehrter Ca^{2+} -Verlust aus dem SR als Ergebnis einer fehlerhaften RyR-Regulation (Bers et al. 2003, Hasenfuss und Pieske 2002). An der luminalen Seite des RyR ist Calsequestrin (CSQ) ein Ca^{2+} -bindendes Protein mit hoher Kapazität aber geringer Affinität für Ca^{2+} über die Transmembranproteine Triadin (TRD) und Junctin (JCN) verankert (Mitchell et al. 1988, Kobayashi und Jones 1999, Jones et al. 1995). TRD und JCN sind homologe Proteine mit einer transmembrandomäne und geladenen Aminosäuren im luminalen C-Terminus (Knudson et al. 1993). RyR, CSQ, TRD und JCN scheinen einen quaternären Komplex im junktionalen SR zu bilden (Jones et al. 1995, Kobayashi et al. 2000, Zhang et al. 1997). Die Ca^{2+} -Sensitivität des RyR könnte durch CSQ, TRD und JCN vermittelt sein (Györke et al. 2004, Jones et al. 1995, Kobayashi und Jones 1999, Terentyev et al. 2002). So scheint CSQ im Zusammenwirken mit TRD ein negativer Regulator des RyR zu sein, was mit Hilfe von CSQ- und TRD-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte. Hier war der Ca^{2+} -Leckstrom aus dem SR und damit die Anfälligkeit für Arrhythmien

bei Knockout-Tieren deutlich erhöht (Chopra et al. 2007, 2009, Knollmann et al. 2006). Die exakte Rolle von JCN ist aber weitgehend unbekannt. JCN könnte wie TRD als Ca^{2+} -Sensor fungiert oder die Interaktion zwischen dem RyR und CSQ vermitteln (Jones et al. 1995, Kobayashi et al. 2000). Dieser Fragestellung wurde in der Vergangenheit unter anderem durch transgene Tiermodelle nachgegangen. Eine herzspezifische Überexpression von entweder CSQ, TRD oder JCN in transgenen Mäusen führte zu einer erhöhten Expression des Transgens aber immer auch zu einer verminderten Expression von anderen SR-Proteinen. Die Folge waren eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase und kardiale Dysfunktionen (Jones et al. 1998, Kirchhefer et al. 2001, 2003, Zhang et al. 2001). Neuere Ansätze mit Knockout-Mäusen, bei denen die verschiedenen SR-Proteine (CSQ, TRD, JCN) genetisch entfernt wurden, haben ihre Bedeutung für die Kopplung von Erregung und Kraft unterstrichen und einen Zusammenhang mit Katecholamin-induzierten Arrhythmien dargelegt (Chopra et al. 2007, 2009, Gergs et al. 2017, Knollmann et al. 2006, Yuan et al. 2007). Ein verbessertes Verständnis des *Cross talk* dieser junktionalen SR-Proteine könnte somit zur Entwicklung neuer Therapien der menschlichen Herzinsuffizienz beitragen. Eine weitere Möglichkeit, die Funktion einzelner SR-Proteine zu untersuchen, stellen adenovirale Expressionssysteme in isolierten Kardiomyozyten dar (Fan et al. 2007, Terentyev et al. 2003, 2005). Der Vorteil dieser Zellkulturmodelle liegt in dem Fehlen gegenregulatorischer Expressionsveränderungen anderer Proteine, welche die Interpretation früherer Ergebnisse mit transgenen Mäusen erschwert haben.

2. ZIELSTELLUNG

Beim Menschen hat Serotonin einen positiv inotropen Effekt, der über kardiale 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt wird. Ein Ziel war es daher, die mRNA-Expression und Funktion von Serotoninrezeptoren sowie deren Signaltransduktion im menschlichen Herzen weiter zu charakterisieren. Insbesondere stellte sich die Frage, ob sich die Expression des 5-HT₄-Rezeptors zwischen Vorhof und Ventrikel unterscheidet und ob verschiedene Isoformen des Rezeptors exprimiert werden. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob Serotonin den IP₃-Spiegel im menschlichen Vorhof erhöhen kann und ob die Phosphorylierung von PLB und/oder TnI erhöht ist. Ferner sollte ein Tiermodell für den menschlichen kardialen 5HT₄ Rezeptor erstellt werden.

Klinisch haben Adenosin und ATP einen Nutzen bei der Behandlung supraventrikulärer Arrhythmien. Somit ist die Wirkung von ATP und Adenosin auf den menschlichen Vorhof von klinischer Bedeutung und verdient weitere Untersuchungen.

Inotrope Effekte von ATP am menschlichen Herzen – Vorhof oder Ventrikel – sind bisher nicht beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, ob ATP die Kontraktilität des menschlichen Vorhofs auf die gleiche Weise beeinflusst, wie es vom Rattenvorhof bekannt ist, also ein DPCPX-sensitiver negativ inotroper Effekt gefolgt von einem Suramin-sensitiven positiv inotropen Effekt.

Eine weitere Hypothese war, auch Adenosin, ein Metabolit von ATP, zeige in vergleichbarer Weise inotrope Effekte am isolierten menschlichen Vorhof.

Die reversible Proteinphosphorylierung ist ein wesentlicher regulatorischer Mechanismus für Kontraktilität der Herzmuskelzellen und deren Ca²⁺-Homöostase. Abweichungen in der Funktion der Proteinphosphatasen können zu Krankheiten des Menschen führen oder beitragen.. Basierend auf diesen Daten wurde die Hypothese aufgestellt, eine erhöhte Expression von PP2A könne ähnlich wie PP1 die Herzfunktion beeinflussen. Deshalb wurden transgene Mäuse hergestellt, welche die katalytische Untereinheit der PP2A herzspezifisch überexprimieren, um mehr über die Funktion von Proteinphosphatasen im Säugerherzen zu erfahren. Ferner wurde untersucht, wie diese Tiere Stress wie z.B. einen experimentellen Herzinfarkt verarbeiten könnten.

Eine weitere Hypothese war, eine erhöhte Expression des PP1-Inhibitors I-2 könne die durch transgene PP1-Überexpression bedingte Hypertrophie und erhöhte Sterblichkeit vermindern. Dazu wurden Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von I-2 und PP1 gekreuzt, um die funktionellen und biochemischen Auswirkungen in den doppelt transgenen Mäusen zu untersuchen.

Ein verbessertes Verständnis der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase in der Herzmuskelzelle und des *Cross talk* der junktionalen SR-Proteine könnte zur Entwicklung neuer Therapien der menschlichen Herzinsuffizienz beitragen.

Die Bedeutung der junktionalen SR-Proteine für die Ca^{2+} -Homöostase wurde bereits mit verschiedenen Tiermodellen untersucht. Daraus ergab sich die Hypothese, es komme auch bei der menschlichen Herzinsuffizienz zu veränderter Expression von junktionalen SR-Proteinen.

Um die Funktion von Junctin weitergehend zu untersuchen, wurde ein adenovirales Expressionssystem verwendet und Junctin in Rattenkardiomyozyten überexprimiert. Der Vorteil dieses Zellkulturmodells liegt in dem Fehlen gegenregulatorischer Expressionsveränderungen anderer Proteine, welche die Interpretation früherer Ergebnisse mit transgenen Mäusen erschwert haben.

3. ANGEWANDTE METHODEN

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden. Die genauen Protokolle dieser Methoden sind ausführlich in den beigegeführten Originalarbeiten beschrieben.

3.1. Menschliches Herzgewebe

Linksventrikuläre Gewebeproben stammten von insuffizienten menschlichen Herzen, die im Rahmen von Herztransplantationen explantiert wurden. Kontrollproben von gesunden Herzen stammten von voraussichtlichen Organspendern, deren Herzen aus technischen Gründen nicht verwendet werden konnten (Neumann et al. 1999, **Publikation 4.4**). Proben von menschlichen rechten Vorhöfen wurden von Patienten gewonnen, die sich entweder einer Bypass- oder Aortenklappen-Operation unterziehen mußten (**Publikationen 4.6, 4.7 und 4.13**). Alle Studienprotokolle wurden von den örtlichen Ethikkommissionen genehmigt (Az 532/116/ 9.7.1991; Nr. 1228/1997 und hm-bü 04.08.2005) und die Patienten haben ihre schriftliche Einwilligung gegeben.

3.2. Transgene Mäuse

Es wurden transgene Mäuse mit einer Herzmuskelzell-spezifischen Überexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2A α ; **Publikationen 4.1, 4.2 und 4.3**), der katalytischen Untereinheit der PP1 (PP1 α ; Carr et al. 2002), der C-terminal verkürzten Variante des Inhibitors 2 der PP1 (I-2¹⁴⁰; Kirchhefer et al. 2005, **Publikation 4.14**) oder des Serotoninrezeptors Typ 4a (5-HT_{4a}; **Publikationen 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 und 4.12**) verwendet. Die Expressionsvektoren beinhalteten den Promoter der schweren Kette des Mauserz- α -Myosins (α MHC) und eine SV40-Polyadenylierungs-Signalsequenz.

3.3. Rekombinante Adenoviren

Rekombinante Adenoviren, welche die cDNA des Hunde-Junctin-Gens (Ad-JCN), des Hunde-Calsequestrin-Gens (Ad-CSQ) oder des Hunde-Triadin-Gens (Ad-TRD) enthielten, wurden nach der Methode von He et al. (1998) hergestellt. Das Adenovirusgenom vom Typ Ad5 wies Deletionen in den Genen E1 und E3 auf. Diese Deletionen stellen eine gentechnische Sicherheitsmaßnahme dar, um eine unkontrollierte Replikation der Viren zu verhindern. Die Expression des Transgens und des Reportergens (hier das Grün-fluoreszierende Protein: GFP) standen unter Kontrolle

eines eigenen CMV-Promoters. Als Kontrolle diente ein Adenovirus, der nur das Reporter-gen GFP enthielt (Ad-Control) (**Publikationen 4.4 und 4.5**).

3.4. Isolierte Rattenkardiomyozyten

Es wurden sowohl neonatale als auch adulte Rattenherzmuskelzellen isoliert und für die Infektion mit Adenoviren eingesetzt. Zwei Tage nach Infektion der Zellen mit den beschriebenen Adenoviren (MOI = 100) konnten diese für Versuche verwendet werden (**Publikationen 4.4 und 4.5**).

3.5. Isolierte Mauskardiomyozyten

Zur Messung von Ca^{2+} -Transienten, Zellverkürzung und L-Typ- Ca^{2+} -Strömen wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen von adulten transgenen und Wildtyp-Mäusen isoliert (Kirchhefer et al. 2001, **Publikationen 4.1, 4.8 und 4.9**).

3.5.1. Ca^{2+} -Transienten

Für die Messung von Ca^{2+} -Transienten an isolierten Kardiomyozyten wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1/AM beladen und mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert (Kirchhefer et al. 2001). Die Bestimmung des SR- Ca^{2+} -Gehaltes erfolgte durch schnelle Applikation einer 10 mM Coffeinlösung (**Publikationen 4.1, 4.4 und 4.8**). Desweiteren wurde auch der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff X-rhod-1/AM in Kombination mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop eingesetzt (**Publikation 4.5**).

3.5.2. Zellverkürzung

Die relative Zellverkürzung von stimulierten Kardiomyozyten wurde mit einem Videogestützten „edge detection“ System gemessen. Dabei wurde die maximale Kontraktion in Prozent der Ruhelänge der Zelle angegeben (Kirchhefer et al. 2001, Langer et al. 2003, **Publikationen 4.1 und 4.4**).

3.5.3. L-Typ- Ca^{2+} -Ströme

Die Messung von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen an isolierten Kardiomyozyten erfolgte mit der Patch-Clamp-Technik unter Bedingungen, bei denen Na^{+} - und K^{+} -Ströme unterdrückt wurden (Kirchhefer et al. 2001, **Publikationen 4.1 und 4.8**).

3.6. Northern-Blot-Analyse und RT-PCR

Die Isolation von Gesamt-RNA oder mRNA aus Mäuseherzen oder kultivierten Zellen erfolgte mittels üblicher Standardmethoden (**Publikationen 4.1, 4.4, 4.7 und 4.8**). Für eine Northern-Blot-Analyse wurden radioaktiv (^{32}P) markierte cDNA-Sonden eingesetzt (**Publikationen 4.1 und 4.4**). Die RT-PCR wurde mit (+RT) und als Kontrolle ohne (-RT) reverse Transkriptase durchgeführt. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mit einem HPLC-System (Murphy et al. 1990). Die Identität der PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung überprüft (**Publikation 4.7**).

3.7. Nachweis von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und cAMP

Zunächst wurde die Bildung von IP_3 bzw. cAMP in kontrahierenden Gewebepräparationen mit 5-HT oder Isoprenalin stimuliert. Nach Stabilisierung des inotropen Effekts wurden die Vorhofpräparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und der IP_3 - bzw. cAMP-Gehalt bestimmt (Danielsen et al. 1989, Mayr und Thieleczek 1991, Lær et al. 1998b, **Publikation 4.7**).

3.8. Nachweis von Tryptophan, Serotonin und Katecholaminen

Für den Nachweis der verschiedenen Signalmoleküle in Blutplasma, Herzgewebe und Zellkulturen wurden die Proben mit verschiedenen Extraktionsmethoden aufgearbeitet und mit einem HPLC-System quantifiziert (**Publikationen 4.8 und 4.9**).

3.9. Western-Blot-Analysen

Für Western-Blot-Analysen wurden Herzhomogenate oder Zellysate wie beschrieben hergestellt. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) oder Lowry et al. (1951) bestimmt. Es folgten eine SDS-Gelelektrophorese und ein Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen sowie abschließend der immunologische Nachweis verschiedener Proteine. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Chemifluoreszenz oder radioaktiv mit ^{125}I -markiertem Protein A (**Publikationen 4.1 bis 4.5, 4.7, 4.8, 4.10 und 4.14**).

3.10. Proteinphosphatase-Messungen

Die Aktivitäten von PP1 und PP2A wurden mit [^{32}P]-markierter Phosphorylase a als Substrat gemessen, wie in Neumann et al. (1993) beschrieben, da die Phosphorylase a ein bekanntes Substrat der katalytischen Untereinheiten der PP1 und PP2A darstellt (Shenolikar und Nairn 1991). Eine Unterscheidung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität

wurde ermöglicht durch die unterschiedliche Hemmwirkung des Phosphataseinhibitors Okadasäure (**Publikationen 4.1 und 4.14**).

3.11. Histologie und Immunzytochemie

Um die morphologischen Strukturen von transgenen Herzen zu analysieren, wurden die Herzen in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden entwacht, rehydriert und nach verschiedenen Methoden gefärbt: Hämatoxylin und Eosin (Übersichtsfärbung); Elastica van Giesson, Sirius-Rot oder Masson-Goldner (Fibrosefärbungen); immunzytochemische Analysen zum Nachweis spezifischer Antigene (**Publikationen 4.1, 4.8, 4.9, 4.12 und 4.14**).

3.12. Echokardiographie

Transthorakale Echokardiographiemessungen wurden an Mäusen durchgeführt, die zuvor mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin anästhetisiert wurden. Unter dieser Narkose war eine spontane Atmung der Tiere möglich (**Publikationen 4.1, 4.8 und 4.14**).

3.13. Invasive Hämodynamik

Für Linksherzkatheter-Untersuchungen wurden die Mäuse mit Tribromethanol narkotisiert. Über die rechte Karotis wurde ein Polyethylenkatheter in den linken Ventrikel geschoben. Über die linke Jugularvene wurde ein intravenöser Zugang gelegt, über den steigende Dosen des β -Adrenozeptor-Agonisten Dobutamin verabreicht wurden (Kirchhefer et al. 2005, **Publikationen 4.1, 4.8 und 4.14**).

3.14. Aktionspotentiale am isolierten Herzen

Für die Untersuchung von Aktionspotentialen wurden Maus Herzen isoliert und in einer modifizierten Langendorff-Apparatur retrograd perfundiert. Die Apparatur war mit drei Kathetern zur Messung monophasischer Aktionspotentiale ausgestattet (Kirchhof et al. 2004, **Publikationen 4.8 und 4.14**).

3.15. Kontraktionskraftmessungen an isolierten Vorhofpräparaten

Messungen an menschlichen Vorhofpräparaten wurden wie schon beschrieben durchgeführt (Böhm et al. 1984, 1986, Læer et al. 1998b, Neumann et al. 1999, Vahlensieck et al. 1999, Zimmermann et al. 2000). So wurden Trabekel aus dem rechten Vorhof von Patienten, die aufgrund einer koronaren Herzkrankheit operiert

wurden (s.o.), in einer begasten Badlösung untersucht (**Publikationen 4.6, 4.7 und 4.13**). Für einige Experimente wurden linke und rechte Vorhöfe von Mäusen unter den gleichen Bedingungen wie die menschlichen Vorhofpräparate verwendet (Kirchhefer et al. 2001) (**Publikationen 4.6, 4.10 bis 4.13**).

3.16. Kontraktionskraftmessungen an isolierten Ventrikeln

Für die *in-vitro*-Untersuchung der ventrikulären Funktion von Mauserzen wurde die Methode des isoliert perfundierten Arbeit-leistenden Herzen eingesetzt (Kirchhefer et al. 2001, **Publikation 4.8**).

3.17. Datenanalyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte entweder mit einem t-Test zum Vergleich von zwei Gruppen oder mit Zwei-Wege-ANOVA zum Vergleich mehrerer Gruppen gefolgt von einem Bonferroni-Test. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant bezeichnet. Korrelationen wurden, wo notwendig, mit einem χ^2 -Test analysiert.

4. LISTE DER ORIGINALARBEITEN

4. 1.	Gergs U , Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. <i>J Biol Chem</i> 279(39): 40827-40834
4. 2.	Cheng G, Takahashi M, Shunmugavel A, DePaoli-Roach AA, Gergs U , Neumann J, Kuppuswamy D, Menick DR, Cooper G IV (2010) Basis for MAP4 dephosphorylation-related microtubule network densification in pressure overload cardiac hypertrophy. <i>J Biol Chem</i> 285: 38125-38140
4. 3.	Höhn M, Zhang Y, Xu J, Gergs U , Boknik P, Werdan K, Neumann J, H. Ebel (2015) Overexpression of protein phosphatase 2A in a murine model of chronic myocardial infarction leads to increased adverse remodelling but restores the regulation of β -catenin by glycogen synthase kinase 3 β . <i>Int J Cardiol</i> 183: 39-46
4. 4.	Gergs U , Berndt T, Buskase J, Jones LR, Kirchhefer U, Müller FU, Schlüter KD, Schmitz W, Neumann J (2007) On the role of junctin in cardiac Ca^{2+} handling, contractility, and heart failure. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 293(1): H728-H734
4. 5.	Gergs U , Kirchhefer U, Buskase J, Kiele-Dunsche K, Buchwalow IB, Jones LR, Schmitz W, Traub O, Neumann J (2011) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in neonatal rat cardiac myocytes. <i>J Mol Cell Cardiol</i> 51: 682-688
4. 6.	Gergs U , Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 294(4): H1716–H1723
4. 7.	Gergs U , Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, Lär S (2009) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT ₄ -receptors in the isolated human atrium. <i>Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol</i> 379(4): 349-359
4. 8.	Gergs U , Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Günther S, Hauptmann S, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rückschloß U, Schmitz W, Schulz N, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT ₄ -receptor in mice. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 299:H788-H798

4.9.	Pönicke K, Gergs U , Buchwalow I, Hauptmann S, Neumann J (2012) On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. <i>Mol Cell Biochem</i> 365(1-2):301-312
4.10.	Gergs U , Böckler, A, Ebel H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J (2013) Human 5-HT ₄ -receptor stimulation in atria of transgenic mice. <i>Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol</i> 386(5): 357-367
4.11.	Gergs U , Fritsche J, Fabian S, Christ J, Neumann J (2017) Desensitization of the human 5-HT ₄ receptor in isolated atria of transgenic mice. <i>Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol</i> 390(10):987-996
4.12.	Gergs U , Jung F, Buchwalow IB, Hofmann B, Simm A, Treede H, Neumann J (2017) Pharmacological and physiological assessment of serotonin formation and degradation in isolated preparations from mouse and human hearts. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 313(6): H1087-H1097
4.13.	Gergs U , Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2009) A positive inotropic effect of adenosine in isolated right atria from diseased human hearts. <i>Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol</i> 379(5): 533-540
4.14.	Brüchert N, Mavila N, Boknik P, Baba HA, Fabritz L, Gergs U , Kirchhefer U, Kirchhof P, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J (2008) Inhibitor-2 prevents protein phosphatase 1-induced cardiac hypertrophy and mortality. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 295(4): H1539-H1546

5. ZUSAMMENFASSUNG DER EIGENEN ARBEITEN

Reversible Proteinphosphorylierungen stellen Mechanismen der Signalübertragung dar, die aber auch zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beitragen können. Der Phosphorylierungszustand von Proteinen wird über eine Balance zwischen Proteinkinasen und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen reguliert. Sowohl Kinasen als auch Phosphatasen werden u.a. über intrazelluläre sekundäre Botenstoffe reguliert, die infolge externer Stimuli (z.B. Noradrenalin, Serotonin, ATP, Adenosin) gebildet worden sind. Im Herzen scheinen PP1, PP2A und PP2B (Calcineurin) die Hauptphosphataseaktivität darzustellen. In den letzten Jahren haben zahlreiche Arbeiten sehr detailliert die Zusammenhänge zwischen der Regulation von Calcineurin und einer Herzhypertrophie und/oder Herzinsuffizienz untersucht (z.B. Molkentin et al. 1998; Lim und Molkentin 1999; El-Armouche et al. 2006). Die PP1 hat sich als scheinbar negativer Regulator der Herzfunktion erwiesen. So führte die Überexpression von PP1 in Herzen transgener Mäuse zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz (Carr et al. 2002), während die Überexpression der PP1-Inhibitoren I-1 oder I-2 die Herzfunktion verbesserte (Pathak et al. 2005; Kirchhefer et al. 2005). In explantierten insuffizienten menschlichen Herzen konnte eine erhöhte sarkoendoplasmatische PP1-Aktivität und/oder Expression nachgewiesen werden (z.B. Mishra et al. 2002; Neumann et al. 1997). Wir haben die Bedeutung der PP2A und der PP1 für die Herzfunktion mit Hilfe transgener Tiermodelle mit herzspezifischer Überexpression von PP2A, PP1 und I-2 näher untersucht. Darüber hinaus bestand das Ziel, die Untersuchungen auf die Bedeutung extrazellulärer Stimuli (Serotonin, ATP und Adenosin) und deren Auswirkungen auf die Signaltransduktion, kardiale Kontraktilität und Ca^{2+} -Homöostase zu erweitern. Dies wurde mittels *in-vitro*-Versuchen an isolierten Vorhofpräparaten von Mensch und Maus bzw. transgenen Mäusen umgesetzt. Bezüglich der Ca^{2+} -Homöostase gibt es zahlreiche Untersuchungen zur Bedeutung der Proteinkomplexe, die für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (Ryanodinrezeptor oder RyR) bzw. für die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR (SERCA) zuständig sind. Diese werden in ihrer Funktion u.a. über externe Stimuli z.B. via Phosphorylierung und Zusammensetzung der Komplexe reguliert. Hier haben wir die Funktion von Junctin, einem Bestandteil des RyR-Komplexes genauer untersucht. So stellte sich die Frage, ob Junctin ein negativer oder positiver Regulator der Ca^{2+} -Freisetzung ist. Dazu haben wir u.a. ein adenovirales

Expressionssystem eingesetzt, um eine erhöhte Junctin-Expression in isolierten Herzmuskelzellen zu erzeugen.

5.1. Serotonin

Publikationen 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 und 4.12

Serotonin (5-HT) scheint an kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt zu sein. Zum Beispiel kann 5-HT kardiale Arrhythmien auslösen bzw. unterhalten (Kaumann 1994) und eine Erkrankung der Herzklappen auslösen (Robiolio et al. 1995). Unter bestimmten Umständen kann es zu erhöhten Blutspiegeln von 5-HT kommen. Dazu zählen z.B. Verschluss und Reperfusion der Koronargefäße, Patienten mit Bluthochdruck und Herzinsuffizienz, Alterungsprozesse und das Karzinoid-Tumor-Syndrom (Übersicht bei Kaumann und Levy 2006). Desweiteren konnten wir zeigen, wie 5-HT auch in Mauskardiomyozyten gebildet werden kann. Ferner waren alle zur Synthese und Abbau des 5-HT notwendigen Enzyme funktionell und immunologisch bei Maus und Mensch nachweisbar (Pönicke et al. 2012, Gergs et al. 2017, Publikationen 4.9 und 4.12). Die mRNA und basierend auf Radioligandenstudien auch das Protein von 5-HT-Rezeptoren sind in Herzen von Ratte und Mensch nachgewiesen worden (Blondel et al. 1997, 1998; Foguet et al. 1992; Gerald et al. 1995; Læer et al. 1998a). Somit scheint 5-HT im Vorhof den positiv inotropen Effekt über die Aktivierung von 5-HT₄-Rezeptoren, die positiv an die Adenylylzyklase koppeln, auszuüben. Diese Schlußfolgerung basiert auf mehreren Beobachtungen. Der inotrope Effekt von 5-HT in menschlichen Vorhofpräparationen war, in Übereinstimmung mit Kaumann et al. (1990), empfindlich gegenüber 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten, nicht aber gegenüber 5-HT₂-Rezeptor-Antagonisten. Wir haben 5-HT₄-Rezeptor-mRNA im Vorhofgewebe nachgewiesen (wie in Blondel et al. 1997). 5-HT stimulierte die Relaxation (wie in Kaumann et al. 1990), ein typisches Zeichen für einen cAMP - aber nicht IP₃ - Anstieg. Und 5-HT führte zu einem Anstieg von cAMP (wie in Kaumann et al. 1990), nicht aber von IP₃ in kontrahierenden Vorhofpräparationen. Deshalb scheint der 5-HT-induzierte positiv inotrope Effekt cAMP-vermittelt zu sein. Außerdem erhöhte 5-HT die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase in menschlichen Vorhofpräparaten (Kaumann et al. 1990). Um diese Daten weiter zu vervollständigen, haben wir den Phosphorylierungszustand kardialer regulatorischer Proteine gemessen. Denn ein Einwand könnte sein: unter bestimmten Umständen führe ein erhöhter cAMP-Spiegel nicht zur Proteinphosphorylierung und deshalb auch nicht zu verstärkter

Relaxation und Inotropie. Genau dies wurde für Prostaglandin E₁ und die Stimulation von A₂-Adenosinrezeptoren gezeigt. Der cAMP-Spiegel in isolierten Herzmuskelzellen stieg unter den entsprechenden Agonisten an, aber nicht die Kontraktionskraft oder Relaxation (Kaumann und Birnbaumer 1974; Boknik et al. 1997). Hier aber war der cAMP-Anstieg von einer beschleunigten Relaxation der isolierten Vorhofpräparate und einem Anstieg der Kontraktionskraft begleitet, was zumindest teilweise mit einer erhöhten PLB- und TnI-Phosphorylierung erklärt werden kann. Eine 5-HT-induzierte PLB- und TnI-Phosphorylierung ist bisher noch nicht an menschlichen Herzpräparationen untersucht worden. Anders bei der Ratte: sechs Wochen nach Erzeugung eines Infarktes induzierte 5-HT die Phosphorylierung von PLB und TnI vermutlich über 5-HT₄-Rezeptoren (Birkeland et al. 2007). Eine vermehrte Phosphorylierung von PLB führt, wie schon in der Einleitung erwähnt, zu einem erhöhten Ca²⁺-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums (Simmerman und Jones 1998). Dieses Ca²⁺ kann freigesetzt werden und könnte die Ursache für kardiale Arrhythmien sein, z.B. durch Induktion von späten Nachdepolarisationen (Yusuf et al. 2003). In der Tat ist 5-HT dafür bekannt, Arrhythmien beim Menschen auszulösen (Christ et al. 2014, Kaumann und Sanders 1994, Übersicht in Kaumann 1994). Außerdem wurde die mRNA für den 5-HT_{2A}-Rezeptor im menschlichen Vorhof nachgewiesen, aber es gab keinen 5-HT-induzierten IP₃-Anstieg wie er in anderen Geweben gezeigt wurde (Übersicht in Hoyer et al. 1994). Möglicherweise koppelt der 5-HT_{2A}-Rezeptor im menschlichen Vorhof an das MAP-Kinase-System (Xu et al. 2002), was noch zu untersuchen wäre. Oder möglicherweise wird die mRNA für den Rezeptor nicht translatiert, oder die Proteinmengen des Rezeptors sind zu gering, um irgendeine IP₃-Bildung sicher messen zu können. Sollte der 5-HT_{2A}-Rezeptor exprimiert sein, so koppelt er im menschlichen Vorhof wohl nicht an die Kontraktionskraft (im Gegensatz zum Rattenvorhof: Lær et al. 1998a, b), da der inotrope Effekt von 5-HT nicht durch den 5-HT_{2A}-Antagonisten Ketanserin aufgehoben wurde (diese Arbeit und Kaumann et al. 1990). Möglicherweise wird der 5-HT_{2A}-Rezeptor nicht in den Kardiomyozyten selbst exprimiert, sondern auf niedrigem Niveau in anderen Zelltypen des Herzens. Zum Beispiel wurde die mRNA des 5-HT_{2A}-Rezeptors auch in den Koronargefäßen der Ratte gefunden (Ullmer et al. 1995). Möglicherweise wird der Rezeptor nur unvollständig gebildet und/oder koppelt nicht funktionell an die IP₃-Bildung, wie dies für das menschliche Gehirn beschrieben wurde (Guest et al. 2000). Interessanterweise wurde in menschlichem linksventrikulärem Gewebe aus

insuffizienten Herzen ein Anstieg der 5-HT_{2A}-Rezeptor-mRNA gemessen (im Vergleich zu gesunden Spenderherzen). Die Autoren haben spekuliert, die erhöhte Rezeptorexpression könne zur Herzhypertrophie beitragen (Brattelid et al. 2007). Dies könnte auch für den Vorhof gelten. Wir waren allerdings nicht in der Lage, mRNA für den 5-HT_{2A}-Rezeptor im menschlichen Ventrikel nachzuweisen. Im Gegensatz dazu ist dies Brattelid et al. (2007) gelungen. Wir nehmen an, deren PCR-Protokoll (TaqMan-System) könnte sensitiver als unsere Methode gewesen sein, womit diese Diskrepanz erklärt werden könnte. Vor einigen Jahren wurden funktionelle 5-HT₄-Rezeptoren im menschlichen Ventrikel entdeckt. In Gegenwart des klassischen Phosphodiesterasehemmstoffes IBMX hatte 5-HT einen positiv inotropen Effekt in isolierten elektrisch gereizten Proben aus dem menschlichen Ventrikel (Brattelid et al. 2004b). Unsere Hypothesen bezüglich der schwachen inotropen Antwort im menschlichen Ventrikel waren: die Expression des entsprechenden 5-HT₄-Rezeptors sei sehr niedrig oder das Expressionsmuster weiche im Vergleich zum Vorhof ab. Um diese Annahmen zu testen, haben wir die mRNA-Expression der 5-HT₄-Rezeptoren in Ventrikeln von verschiedenen Patienten mittels RT-PCR untersucht, in Anlehnung an Blondel et al. (1998). Nach unseren Ergebnissen wird die mRNA für den 5-HT₄-Rezeptor im menschlichen Vorhof und Ventrikel exprimiert, aber die Expression im Ventrikel war deutlich geringer, verglichen mit dem Vorhof. Somit könnte das Fehlen eines positiv inotropen Effekts von 5-HT am menschlichen Ventrikel mit einer zu geringen Zahl an 5-HT₄-Rezeptoren auf den Kardiomyozyten erklärt werden, insbesondere bei Abwesenheit einer Phosphodiesterase-Hemmung. Außerdem konnten wir die Hypothese widerlegen, im menschlichen Vorhof und Ventrikel würden verschiedene Isoformen von 5-HT₄-Rezeptoren exprimiert, womit der abgeschwächte inotrope Effekt von 5-HT im Ventrikel hätte erklärt werden können. Auch haben wir das mRNA-Expressionsmuster von 5-HT₄-Spleißvarianten im menschlichen Ventrikel untersucht und fanden im Ventrikel die gleichen Spleißvarianten wie im Vorhof, nämlich 5-HT_{4a}, 5-HT_{4b} und 5-HT_{4c}-Rezeptoren. Wie auch in der Literatur berichtet, sind dies die vorzugsweise exprimierten Isoformen im Herzen (Vorhof: Lezoualc'h et al. 2007; Ventrikel: Brattelid et al. 2004a, b). Somit ist ein Ergebnis dieser Arbeit: qualitative Unterschiede in der Expression von 5-HT₄-Isoformen können nicht die Unterschiede der 5-HT-induzierten Inotropie zwischen Vorhof und Ventrikel erklären. Neu ist ferner der Nachweis des 5-HT_{4c}-Rezeptors im menschlichen Herzen. Welche Funktion könnte dieser Rezeptor im Vergleich zu den anderen 5-HT₄-

Rezeptorisoformen haben? Jedenfalls erhöhte der in COS-Zellen exprimierte 5-HT_{4c}-Rezeptor die basale Adenylylzyklaseaktivität, im Gegensatz zu 5-HT_{4a,b,d}-Rezeptoren (Blondel et al. 1998). Man könnte spekulieren, dies sei auch in Herzmuskelzellen der Fall und eine mögliche Funktion dieser Isoform könnte das Aufrechterhalten eines hohen basalen cAMP-Spiegels und damit eines hohen Levels der Kraftentwicklung sein. Einschränkend ist allerdings zu erwähnen: die erhöhte basale Adenylylzyklaseaktivität in den transfizierten Zellen (Blondel et al. 1998) könnte ihre Ursache in der 20-fach höheren Rezeptordichte verglichen mit dem menschlichen Vorhof haben (Kaumann et al. 1996). Im Gegensatz zu anderen Säugern, konnten bisher im Mausherz keine funktionellen 5-HT-Rezeptoren nachgewiesen werden, obwohl 5-HT₄-mRNA gefunden wurde (Liu et al. 2005, Azim et al. 2012). Auf diesen Erkenntnissen basierend haben wir transgene Mäuse mit Herz-spezifischer Expression des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors hergestellt. An diesen 5-HT₄ transgenen Mäusen konnten wir die wesentlichen Befunde an isolierten Vorhofpräparaten bestätigen (Gergs et al. 2013, Publikation 4.10). Ferner konnten wir *in vivo* die Wirkung von 5-HT auf die kardiale Funktion und das EKG zeigen (Gergs et al. 2010, 2013, Publikationen 4.8 und 4.10). *In vitro* konnten wir an transgenen Vorhofpräparaten eine homologe Desensitivierung der Funktion durch 5-HT zeigen (Gergs et al. 2017, Publikation 4.11).

5.2. ATP

Publikation 4.6

Der neue Hauptbefund dieser Arbeit ist: ATP kann im menschlichen Vorhof einen positiv inotropen Effekt bewirken. Weiterhin offen ist, ob dies auch für den menschlichen Ventrikel zutrifft. Die ATP-Konzentration innerhalb einer Zelle, einschließlich Kardiomyozyten, beträgt etwa 10 mM. Dies ist deutlich höher als die ATP-Konzentration im extrazellulären Raum, die etwa bei 1 bis 40 nM liegt (Kuzmin et al. 1998). Somit existiert ein sehr großer Konzentrationsgradient für ATP über der Plasmamembran. Unter normalen Bedingungen können sehr geringe Mengen ATP, üblicherweise als MgATP²⁻, die Plasmamembran von innen nach außen passieren. Allerdings ist der exakte Mechanismus, wie ATP durch die intakte Zellmembran transportiert wird oder aus Muskelzellen freigesetzt wird noch nicht ganz verstanden. In den Übersichtsarbeiten von Corriden und Insel (2010), Praetorius und Leipziger (2009) und Sawada et al. (2008) werden aktuell diskutierte Möglichkeiten der ATP-Freisetzung vorgestellt. Eventuell fungiert der Chlorid-Kanal CFTR (= cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator) auch als ATP-Kanal oder er reguliert einen ATP-Kanal (Sugita et al. 1998, Vassort 2001). Für die ATP-Freisetzung aus Epithelzellen wurden verschiedene Wege angenommen: eine leitfähige Pore („Maxi-Anionen-Kanal“: Dutta et al. 2004, bzw. Volumen regulierter Anionen-Kanal: Hisadome et al. 2002), eine vesikuläre Freisetzung, ein ATP-bindender Transporter wie das Glycoprotein *mdr1* (= multi drug resistance) (Abraham et al. 1993), über Connexine (Cotrina et al. 1998), mittels einer Ectoapyrase (Bodas et al. 2000), oder durch Exozytose (Tatur et al. 2007). Auch könnten Zelltyp-spezifische Prozesse beteiligt sein. Wenn es infolge eines Myokardinfarktes zu einer Nekrose kommt, werden große Mengen ATP von den sterbenden Herzmuskelzellen freigesetzt, da die intrazelluläre ATP-Konzentration im millimolaren Bereich liegt (Traut 1994). Abgebaut werden kann ATP von löslichen und an der Zelloberfläche lokalisierten Enzymen wie z.B. Ektonukleotidasen, die auf Endothelzellen vorkommen, aber auch auf Kardiomyozyten und anderen Zelltypen (Bowditch et al. 1985). Scheinbar ist es der ATP⁴-Rest, der an entsprechende Rezeptoren bindet. ATP ist ein Agonist an P-Rezeptoren, die in P₁- und P₂-Rezeptoren aufgeteilt werden. P₂-Rezeptoren sind sensitiver für ATP als für Adenosin während das Umgekehrte für P₁-Rezeptoren gilt. P₁-Rezeptoren werden weiter in A₁, A_{2a}, A_{2b} und A₃ Adenosinrezeptoren unterteilt (Übersicht in: Headrick et al. 2013, Ralevic und Burnstock 1998). A₁-Adenosinrezeptor-Agonisten wie z.B. N⁶-Phenylisopropyladenosin und Adenosin selbst vermindern die Kontraktionskraft von isolierten elektrisch gereizten Vorhofpräparaten des Menschen ohne einen initialen positiv inotropen Effekt (Böhm et al. 1989). Somit kann die Bindung an A₁-Rezeptoren nur den negativ inotropen Effekt von ATP erklären. Eine Erklärung des positiv inotropen Effektes von ATP über Aktivierung von P₁-Rezeptoren scheint nach den hier gezeigten Befunden sehr unwahrscheinlich zu sein. Unterstützt wird diese Folgerung durch die Daten mit einem selektiven A₁-Antagonisten und einem selektiven A₂-Adenosinrezeptor-Agonisten. Dementsprechend wurde der negativ inotrope Effekt von ATP in dieser Studie nicht durch DPCPX, einem A₁-Adenosinrezeptor-Antagonisten (Böhm et al. 1989, Neumann et al. 1989), gehemmt. Selbst hohe Konzentrationen wie 10 µM DPCPX zeigten keine Wirkung. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von denen mit Ratten- und Meerschweinchen-Vorhöfen erhaltenen, wo der negativ inotrope Effekt von ATP durch 0,01 – 0,1 µM DPCPX gehemmt werden konnte (Froldi et al. 1994, Mantelli et al. 1993). Somit scheint der A₁-Adenosinrezeptor hier nicht mit dem negativ inotropen Effekt von ATP in Verbindung zu stehen. Die Stimulation von

A₂-Adenosinrezeptoren durch den selektiven Agonisten CGS-21680 kann die Kontraktionskraft erhöhen, was z.B. am Rattenherz gezeigt wurde (Monahan et al. 2000). Im Gegensatz dazu haben wir mit CGS-21680 (bis zu 10 µM) keinen positiv inotropen Effekt beobachtet, sondern einen leichten und sich langsam entwickelnden negativ inotropen Effekt im menschlichen Vorhof. Somit sind am positiv inotropen Effekt von ATP im menschlichen Vorhof, basierend auf den hier präsentierten Daten und der Literatur, sicherlich keine P₁-Rezeptoren beteiligt und der negativ inotrope Effekt von ATP im menschlichen Vorhof wird wahrscheinlich weder über A₁-Adenosinrezeptoren noch über A₂-Adenosinrezeptoren vermittelt. Höchstwahrscheinlich wirkt ATP über P₂-Rezeptoren im menschlichen Vorhof. P₂-Rezeptoren werden weiter unterteilt in P_{2X}- (Liganden-gesteuerte Ionenkanäle) und P_{2Y}-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren). Im menschlichen Herzen konnten die mRNAs von allen bisher bekannten P_{2X}-Rezeptoren (P_{2X1-7}) und P_{2Y}-Rezeptoren (P_{2Y1,2,4,6,11-14}) nachgewiesen werden (Banfi et al. 2005, Wihlborg et al. 2006). Auf Proteinebene gelang der Nachweis für die Rezeptoren P_{2Y1,2,6,11-13} und P_{2X1-4,6,7} (Banfi et al. 2005, Wihlborg et al. 2006). Die Rezeptoren P_{2Y1,2,6,11,12,13} werden durch Suramin, PPADS oder RB2 gehemmt (von Kügelgen 2006). Da aber diese Antagonisten die kontraktile Wirkung von ATP nicht gehemmt haben, scheinen P_{2Y}-Rezeptoren nicht an der ATP-Wirkung beteiligt zu sein. Ferner koppeln P_{2Y}-Rezeptoren an die Phospholipase C und/oder an die Adenylylzyklase. Jedoch konnten Hemmstoffe dieser Signalwege (10 µM U-73122 oder SQ-22536) die ATP-Effekte nicht beeinflussen, was auch gegen eine Beteiligung von P_{2Y}-Rezeptoren spricht. Die Beteiligung des P_{2Y4}-Rezeptors kommt nicht in Betracht, da ATP an diesem Rezeptor als Antagonist wirkt (Kennedy et al. 2000). Außerdem ist 2-Methyl-thio-ATP inaktiv an P_{2Y2}- und P_{2Y4}-Rezeptoren (von Kügelgen 2006), hatte hier aber den gleichen positiv inotropen Effekt wie ATP. Was die P_{2X}-Rezeptoren anbelangt, sind nur die menschlichen P_{2X4}- und P_{2X6}-Rezeptoren wenig oder gar nicht sensitiv gegenüber den getesteten P₂-Antagonisten Suramin, PPADS und RB2 (Bo et al. 1995, Collo et al. 1996, Jones et al. 2000). 2-Methyl-thio-ATP induzierte einen positiv inotropen Effekt, was für einen P_{2X4}-Rezeptor-vermittelten Effekt spricht. Übereinstimmend mit dieser Annahme waren P_{2X4}-Rezeptoren von Ratte, Maus und Mensch relativ unempfindlich gegenüber Suramin: beispielsweise verminderten 100 µM Suramin einen P_{2X4}-vermittelten Strom nur um 11% (Jones et al. 2000), oder 30 µM Suramin hemmten den P_{2X4}-vermittelten Strom in Kardiomyozyten von P_{2X4}-überexprimierenden transgenen Mäusen nur

unwesentlich (Shen et al. 2006). An Makrophagen wurden P_{2X4} -Rezeptor-vermittelte Effekte von ATP nicht durch Suramin oder PPADS gehemmt (Bowler et al. 2003). In heterologen Expressionssystemen hat sich eine schnelle Desensitivierung (30% in 4 s) des P_{2X4} -Rezeptors durch Agonisten herausgestellt (Fountain und North 2006). Dies steht im Widerspruch zu den hier beobachteten langanhaltenden positiv inotropen Effekten durch ATP. Andererseits stimmen unsere Ergebnisse mit Daten von P_{2X4} -Rezeptor-infizierten Hühnchenkardiomyozyten oder Kardiomyozyten von P_{2X4} -überexprimierenden Mäusen überein (Hu et al. 2001). Die Überexpression von menschlichen P_{2X4} -Rezeptoren in transgenen Mäusen führte außerdem zu einer erhöhten basalen Kontraktilität (Hu et al. 2001). Somit können P_{2X4} -Rezeptoren kardiale Effekte haben, wenigstens nach gentechnisch vermittelter kardialer Überexpression. Eine erhöhte Aktivität und/oder Expression von P_{2X4} -Rezeptoren könnte nützlich sein. So hatte das Kreuzen von P_{2X4} -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen mit Calsequestrin-überexprimierenden Mäusen, einem genetischen Tiermodell der Herzinsuffizienz, positive Auswirkungen auf die Herzfunktion und das Überleben der Tiere (Yang et al. 2004). Noch nicht vollständig untersucht sind, was Agonisten und Antagonisten betrifft, heteromere P-Rezeptoren, die eine Rolle im menschlichen Vorhof spielen könnten (Kennedy 2005). Auch eine Beteiligung von sogenannten „Orphan“-Rezeptoren kann nicht ausgeschlossen werden. Was die physiologische Bedeutung der kontraktilen Effekte von ATP anbelangt, kann nur spekuliert werden. Wie schon erwähnt liegt die intrazelluläre Konzentration von ATP bei etwa 10 mM (Traut 1994, Vassort 2001). Die ATP-Konzentration im Interstitium kann während einer Ischämie oder Streckung des Gewebes erheblich ansteigen (Berne 1963, Borst und Schrader 1991, Kuzmin et al. 1998, Uozumi et al. 1998). Beispielsweise wurde für Endothelzellen aus der Aorta eine ATP-Freisetzung von 2900 fmol/min für 1 Million Zellen gemessen (Oike et al. 2000). Eine weitere Quelle für ATP stellt die Kofreisetzung aus perivaskulären Nerven dar (Burnstock 1972). Die ATP-Konzentration in Erythrozyten beträgt etwa 2 mM und im Blutplasma 0,2 μ M (Kichenin et al. 2000, Traut 1994). Somit kann eine ATP-Freisetzung aus den Erythrozyten sehr schnell zu hohen Plasmakonzentrationen an ATP führen. Die negativ inotropen Effekte von ATP können wahrscheinlich nur eine Rolle für Rückkopplungsmechanismen spielen, da sie nur transient auftreten. Die positiv inotrope Wirkung von ATP ist dagegen über längere Zeit stabil und könnte daher physiologisch wichtig sein, um, falls notwendig, die Kontraktilität zu erhöhen. Ein denkbare Szenario könnte folgendermaßen aussehen: Während eines Myokardinfarktes

werden große Mengen ATP von den sterbenden Herzmuskelzellen freigesetzt, um die Kontraktionskraft in den Bereichen, die nicht vom Zelltod betroffen sind, zu steigern. Auf diese Weise könnte ATP dazu beitragen, die kontraktile Homöostase bei einem akuten Herzversagen zu erhalten. In diesem Zusammenhang könnte man spekulieren, bei chronischer Herzinsuffizienz könne der Einsatz von Hemmstoffen des ATP-Abbaus geeignet sein, die Kontraktilität zu erhalten.

5.3. Adenosin

Publikation 4.13

Die wesentliche neue Entdeckung dieser Arbeit ist: Adenosin kann einen positiv inotropen Effekt am menschlichen Herzen auslösen. Die Adenosin-Konzentration im Koronarsystem steigt während einer β -adrenergen Stimulation und einer Hypoxie an (Bardenheuer et al. 1987, Berne 1963). In den Kardiomyozyten ist die Adenosinkonzentration deutlich höher als im extrazellulären Raum. Somit existiert ein ausgeprägter Konzentrationsgradient für Adenosin über die Zellmembran. Adenosin kann die intakte Zellmembran nur über ein Transportsystem überwinden. Somit könnten in nekrotischem Herzgewebe in Folge eines Myokardinfarktes große Mengen Adenosin von den sterbenden Herzmuskelzellen freigesetzt werden. Adenosin kann nicht nur durch die Degradation von ATP, sondern auch de novo gebildet werden. Metabolisiert wird Adenosin über eine Adenosin-Deaminase zu Inosin, das allgemein als biologisch inaktiv angesehen wird. Adenosin wirkt wie schon zuvor beschrieben über P_1 -Purinozeptoren, die weiter unterteilt werden in A_1 -, A_{2a} -, A_{2b} - und A_3 -Adenosinrezeptoren. Alle vier kommen im Herzen vor (Reppert et al. 1991, Salvatore et al. 1993, Xu et al. 1996). A_1 -Adenosinrezeptoren können negativ inotrope Effekte über die Hemmung der Aktivität der Adenylylzyklase und/oder der Aktivierung von Phosphatasen mittels Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine vermitteln (Böhm et al. 1986, Gupta et al. 1993a, b). Wenn der A_1 -Adenosinrezeptor in Herzmuskelzellen überexprimiert wird, führt seine Stimulation zu einem ausgeprägten positiv inotropen Effekt (Neumann et al. 1999, Kirchoff et al. 2003). Der A_2 -Adenosinrezeptor stimuliert die Aktivität der Adenylylzyklase. In Herzmuskelzellen kann die Stimulation des A_2 -Adenosinrezeptors einen cAMP-Anstieg bewirken (Behnke et al. 1990, Boknik et al. 1997, Stein et al. 1993). Jedoch in unseren Untersuchungen führte die A_2 -Adenosinrezeptor-Stimulation mit CGS-21680 nie zu einem Anstieg der Proteinphosphorylierung oder einem positiv inotropen Effekt (Boknik et al. 1997). Erst

mit der Überexpression dieses Rezeptors in einem transgenen Mausmodell konnte CGS-21680 die Kontraktionskraft und den cAMP-Gehalt im Herzen erhöhen (Grote-Wessels et al. 2007). Im Gegensatz dazu haben wir bisher im menschlichen Vorhof mit CGS-21680 keinen positiv inotropen Effekt beobachtet, sondern einen kleinen und sich langsam entwickelnden negativ inotropen Effekt. Dies spricht gegen die Hypothese, Adenosin übe im menschlichen Vorhof einen positiv inotropen Effekt über die Stimulation von cAMP-erhöhenden A₂-Adenosinrezeptoren aus. Die Stimulation von endogenen oder überexprimierten A₃-Adenosinrezeptoren hat nur eine Abnahme der Kontraktionskraft ergeben (Fabritz et al. 2004). Wie schon in den Mausmodellen hatte auch hier der A₃-Adenosinrezeptor-Agonist IB-MECA nur einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Effekt. Der negativ inotrope Effekt von Adenosin am menschlichen Herzen kann von DPCPX, einem A₁-Adenosinrezeptor-Antagonisten, gehemmt werden (Böhm et al. 1989 und diese Arbeit). Der klassische A₁-Adenosinrezeptor-Agonist namens N₆-Phenyl-Isopropyl-Adenosin (R-PIA) verminderte stets die Kontraktionskraft am menschlichen Vorhof ohne transienten positiv inotropen Effekt (Böhm et al. 1986 und diese Arbeit). Basierend auf den Daten mit Agonisten und Antagonisten, scheint somit der A₁-Adenosinrezeptor am negativ inotropen Effekt von Adenosin beteiligt zu sein. Allerdings stellt sich die Frage, wie der biphasische, anfänglich negativ inotrope, dann positiv inotrope Effekt erklärt werden kann. In einigen Fällen haben wir eine anfänglich massive Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet, gefolgt von einer teilweisen Erholung auf ein konstantes Niveau, das aber immer noch unterhalb der Kraft vor Substanzzugabe lag. Möglicherweise bewirkt Adenosin somit eine A₁-Adenosinrezeptor-vermittelte Abnahme der Kontraktionskraft aufgrund von zwei zeitlich aufeinander folgenden Komponenten. Zusätzlich mag sich auf diese Weise ein veränderter Metabolismus und/oder Transport von Adenosin widerspiegeln. Das Fehlen von Transport und Metabolismus von Adenosin in einigen Patientenproben würde möglicherweise erklären, warum R-PIA nur einen negativ inotropen Effekt zeigt. Aber wie kommt es zu dem positiv inotropen Effekt von Adenosin? Wahrscheinlich war der positiv inotrope Effekt unabhängig von einer cAMP-Bildung, da die Zeitparameter der Kontraktionen nicht verändert waren, was auch eine Adenosin-bedingte Freisetzung von Katecholaminen aus Nervenzellen unwahrscheinlich macht. Wie schon oben erwähnt, können die Eigenschaften der A₂- und A₃-Adenosinrezeptor-Agonisten den positiv inotropen Effekt von Adenosin wohl nicht vermitteln. Weil der selektive A₁-Adenosinrezeptor-Antagonist DPCPX den

positiv inotropen Effekt von Adenosin, sofern er auftrat, wie auch den negativ inotropen Effekt hemmen kann, scheint eine Beteiligung eines Rezeptors, der dem A₁-Adenosinrezeptor sehr ähnlich ist, wahrscheinlich zu sein. Dieser Befund macht andererseits ebenfalls eine Katecholamin-Freisetzung als Ursache des positiv inotropen Effektes von Adenosin unwahrscheinlich, da adrenerge Rezeptoren nicht durch DPCPX blockiert werden. Ferner könnten Veränderungen der Signalweiterleitung von A₁-Adenosinrezeptoren aufgetreten sein. Zum Beispiel kann der A₁-Adenosinrezeptor über G-Proteine auch an K⁺-Kanäle koppeln (Belardinelli und Isenberg 1983). Ein partieller oder kompletter Block dieses Signalweges könnte alternativ oder zusätzlich den verminderten oder fehlenden negativ inotropen Effekt von Adenosin bei einigen Patienten erklären. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, in welcher Beziehung die hier dargestellten Ergebnisse zu den kürzlich veröffentlichten Daten stehen, nach denen ATP einen positiv inotropen Effekt an isolierten Vorhofpräparaten des menschlichen Herzens hat (Gergs et al. 2008). Im Gegensatz zum Adenosin, führte ATP nach einem transienten negativ inotropen Effekt immer zu einem Anstieg der Kontraktionskraft (Gergs et al. 2008, Publikation 4.6). Es gab keine Patienten, bei denen ATP nicht gewirkt hätte (Gergs et al. 2008, Publikation 4.6). Der zugrunde liegende Rezeptor muß ein anderer sein, als der Rezeptor der den positiv inotropen Effekt von Adenosin vermittelt, da der positiv inotrope Effekt von ATP nicht durch DPCPX hemmbar war.

Aufgrund von Untersuchungen mit Agonisten und Antagonisten haben wir die Beteiligung eines P_{2X4}- bzw. P_{2X4}-artigen Rezeptors vermutet (Gergs et al. 2008, Publikation 4.6). Wie aber kann derselbe Rezeptor einmal einen negativ inotropen und dann einen positiv inotropen Effekt vermitteln? Und warum bewirkt der eine Agonist (R-PIA) nur einen negativ inotropen Effekt, während der andere (Adenosin) sowohl einen negativen als auch positiven Effekt zeigt? Vergleichbare Befunde gibt es im α -adrenergen System. Sowohl Phenylephrin als auch Noradrenalin vermitteln in Anwesenheit von β -Adrenozeptorblockern einen positiv inotropen Effekt über α -Adrenozeptoren an isolierten Präparaten aus Herzen zahlreicher Spezies. Interessanterweise ist Phenylephrin im insuffizienten menschlichen Herzen inaktiv, während in derselben Präparation Noradrenalin ein voller Agonist ist (Neumann et al. 1993). Eine Erklärung dafür steht noch aus. Alle hier untersuchten Proben stammten von Patienten, die sich aufgrund einer koronaren Herzkrankheit einer Operation

unterziehen mußten. Wir hatten keinen Zugang zu „normalem“ Gewebe. Somit wäre die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf gesunde Menschen zunächst vorläufig. Wir können nur spekulieren, welche physiologische Bedeutung die kontraktilen Effekte von Adenosin haben. Der negativ inotrope Effekt von Adenosin wurde bisher als Schutz des Herzens gegenüber der schädigenden Wirkung einer β -adrenergen Stimulation durch endogene Katecholamine angesehen (Shyrock und Belardinelli 1997). Dies wurde auch als „indirekter“ Effekt von Adenosin bezeichnet (Shyrock und Belardinelli 1997). Der hier beschriebene positiv inotrope Effekt von Adenosin ist länger andauernd und könnte daher geeignet sein, die Kontraktilität des Herzens zu erhöhen, falls es notwendig sein sollte. Ein denkbares Szenario könnte ähnlich wie für eine ATP-Freisetzung folgendermaßen aussehen: während eines Myokardinfarktes werden große Menge Adenosin freigesetzt, um die Kontraktionskraft in den nicht geschädigten Bereichen des Herzens zu erhöhen. Auf diese Weise könnte Adenosin die kontraktile Homöostase aufrechterhalten. Dieser Mechanismus könnte auch bei terminaler Herzinsuffizienz, bei der die Dichte an β -Adrenozeptoren stark reduziert ist und das Myokard kaum auf endogene und exogene Katecholamine reagiert (Bristow et al. 1982), von Bedeutung sein.

5.4. PP2A

Publikationen 4.1, 4.2 und 4.3

Nach früheren Arbeiten hemmt Okadasäure die aus Säugetierherzen oder menschlichen Herzen gereinigte PP2A (Neumann et al. 1993, Neumann et al. 1999). Die Hemmung der PP2A war von einem Anstieg der PLB- und TnI-Phosphorylierung sowie einem Anstieg des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Stromes begleitet (Neumann et al. 1993). In isolierten elektrisch gereizten Papillarmuskeln erhöhte Okadasäure die Kontraktionskraft und beschleunigte die Kontraktion in ähnlicher Weise wie Isoprenalin (Neumann et al. 1993). Somit sind Proteinphosphatasen mutmaßlich an der kardialen Kraftentwicklung beteiligt. Allerdings konnten die kardialen Effekte von Okadasäure nicht mit der Hemmung einer spezifischen Proteinphosphatase korreliert werden, da Okadasäure im nanomolaren Bereich verschiedene Proteinphosphatasen, z.B. PP2A, PP4 und PP5, gleichermaßen hemmt (Chen et al. 1994). Möglicherweise wird die TnI-Dephosphorylierung wesentlich durch die PP2A katalysiert (Mumby et al. 1987). Hier haben wir eine gegensätzliche Strategie verfolgt: Wir haben ein Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression der katalytischen Untereinheit der PP2A hergestellt,

um die biologische Rolle dieser Proteinphosphatase im Herzen zu untersuchen. Der Anstieg der PP2A-Aktivität im Herzen der transgenen Mäuse war von einer kardialen Hypertrophie, einer verminderten kontraktilen Funktion und einer Dephosphorylierung von PLB, TnI und eEF-2 begleitet. Während bisher noch kein transgenes Tiermodell mit erhöhter PP2A-Expression publiziert wurde, hat der konstitutive Knockout von PP2A klar die Notwendigkeit der PP2A für die Embryonalentwicklung von Mäusen gezeigt. Ohne PP2A sterben die Embryonen bereits an Tag 6 ab. PP2A scheint für die Gastrulation und Mesodermbildung notwendig zu sein (Götz et al. 1998). In einer Studie mit herzspezifischer Überexpression der nukleären δ_B -Isoform der Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase II kam es zu kardialer Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie in den transgenen Mäusen (Zhang et al. 2002). Interessanterweise kann die in dieser Studie überexprimierte Isoform der Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase an die PP2A binden und zusätzlich war die Proteinexpression und Aktivität der PP2A erhöht. Der Mechanismus, wie die nukleären δ_B -Isoform der Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase II zu einem PP2A-Anstieg führt, konnte allerdings nicht geklärt werden (Zhang et al. 2002). Jedenfalls war der Anstieg nicht über eine erhöhte Transkription vermittelt, da die PP2A-mRNA nicht verändert war (Zhang et al. 2002). Ebenso konnten die Autoren nicht klären, ob der Anstieg der PP2A-Expression und -Aktivität die Ursache der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz war, oder ein kompensatorischer Mechanismus gegen die Zunahme der Kinaseaktivität unabhängig von der Hypertrophie (Zhang et al. 2002).

Somit stellt sich die Frage, was die möglichen Mechanismen einer PP2A-induzierten Herzhypertrophie sein könnten? PP2A kann die Proteintranslation (und darüber möglicherweise die Hypertrophie) stimulieren über die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von eEF-2. Die mRNA-Translokation am Ribosom benötigt eEF-2. Eine spezifische Kinase phosphoryliert und hemmt somit eEF-2. Die Phosphorylierung vermindert die Fähigkeit des Elongationsfaktors, die mRNA-Translokation zu fördern, indem die Affinität für das Prätranslokations-Ribosom herabgesetzt wird (Ryazanov et al. 1988, Nairn und Palfrey 1987). PP2A ist die wichtigste Proteinphosphatase für die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von eEF-2 (Redpath und Proud 1990). In neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte Angiotensin II, ein bekannter hypertropher Stimulus, zur Dephosphorylierung von eEF-2 über Aktivierung von PP2A führen (Everett et al. 2001). Hier haben wir eine Dephosphorylierung von eEF-2 in transgenen Herzen gezeigt. Zumindest teilweise kann eine allgemein erhöhte

Proteinphosphataseaktivität zu einer Hypertrophie führen. So bewirkte die herzspezifische Überexpression der PP1 eine verminderte kardiale Funktion und eine dilatative Kardiomyopathie (Carr et al. 2002). Auch eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase wurde als Stimulus für eine kardiale Hypertrophie und Insuffizienz diskutiert (Ljubojevic und Bers 2015). In diesem Zusammenhang könnte eine Dephosphorylierung von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen durch PP1, PP2A oder eine andere Proteinphosphatase für die Induktion einer Hypertrophie verantwortlich sein. Ungeachtet dieser allgemeinen Mechanismen, über die PP2A eine Hypertrophie bewirken könnte, ist es von besonderer Bedeutung, die einzigartigen Eigenschaften der PP2A heraus zu finden. Zum Beispiel hat die Kreuzung von PP2A-überexprimierenden Mäusen mit PP1-Inhibitor-2-überexprimierenden Mäusen zu doppelt transgenen Tieren geführt, die eine deutlich verminderte Gesamtproteinphosphataseaktivität im Herzen aufwiesen, aufgrund des nahezu kompletten Verlustes der PP1-Aktivität. Die PP2A-Aktivität war aber immer noch erhöht und die doppelt transgenen Mäuse entwickelten eine Herzhypertrophie (Brüchert et al. 2004).

Die hier präsentierte PP2A-Überexpression wurde durch den herzspezifischen und starken Promotor der schweren Kette des α -Myosins ermöglicht. Wir konnten die entsprechende mRNA des Transgens im Northern-Blot und das entsprechende Protein im Western-Blot von transgenen Herzen nachweisen. Da die Expression der katalytischen Untereinheit der PP2A einer starken Regulation, die an der Translation ansetzt, unterworfen ist, kann damit der Unterschied zwischen RNA und Protein-Überexpression erklärt werden (Baharians und Schönthal 1998). Nur eine massive RNA-Überexpression scheint in der Lage zu sein, die Regulationsmechanismen zu überwinden und eine erhöhte Proteinexpression zu bewirken. Die Lokalisation der überexprimierten PP2A in den Kardiomyozyten wurde durch immunhistologische Färbungen nachgewiesen. Interessanterweise findet man die PP2A sowohl im Zytosol als auch im Zellkern. Aufgrund der nukleären Lokalisation könnte die überexprimierte PP2A auch die Gentranskription in den Kardiomyozyten beeinflussen. Die überexprimierte PP2A wirkt auf regulatorische Proteine im sarkoplasmatischen Retikulum (PLB), in den kontraktilen Filamenten (TnI) und in der Plasmamembran (Ca^{2+} -Kanäle). Im sarkoplasmatischen Retikulum ist die PP2Ac Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes, der u. a. aus Ryanodinrezeptor, FKBP12.6, PKA, PP1c und mAKAP besteht (Marx et al. 2000). Die PP2Ac wurde auch in Immunpräzipitaten von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen aus dem Rattenhirn gefunden und kann die

PKA-phosphorylierten Kanäle dephosphorylieren (Davare et al. 2000). Im Gehirn konnte auch eine Assoziation der PP2Ac mit einem Proteinkomplex aus β_2 -Rezeptor, L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, G-Protein, Adenylzyklase und PKA gezeigt werden (Davare et al. 2001). Außerdem konnte in einer anderen Arbeit, bei der PP2A über eine Patch-Pipette intrazellulär appliziert wurde, eine Abnahme des basalen L-Typ- Ca^{2+} -Stromes gemessen werden (duBell et al. 1996). Die Bedeutung von Proteinphosphatasen für die Regulation der L-Typ- Ca^{2+} -Kanalaktivität in Mauskardiomyozyten wurde mit Hilfe des PP1/PP2A-Hemmstoffs Calyculin A untersucht. So stieg nach Applikation von Calyculin A die Stromdichte des I_{Ca} an (duBell et al. 2002). In weiteren Untersuchungen konnte PP2A die PKA-vermittelten Effekte auf den Strom durch einen kardialen L-Typ Ca^{2+} -Kanal aufheben (Davare et al. 2000, 2001, duBell und Rogers 2004). Hier führte die Überexpression der PP2A zu einer Abnahme der Stromdichte des I_{Ca} und zu einer verlangsamten Inaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle.

Die erhöhte PP2A-Aktivität, die in den transgenen Herzen nachgewiesen wurde, war mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die Folge der PP2A-Überexpression, da die Expression anderer PP2A-Untereinheiten, wie A- und B-Untereinheit sowie α_4 , welche die PP2A-Aktivität verändern können, unverändert war. Möglicherweise sind ferner freie, also nicht an regulatorische Untereinheiten gebundene PP2Ac in den transgenen Herzen erhöht exprimiert. Dies hätte dann eventuell eine ungerichtete erhöhte Proteinphosphatase-Aktivität zur Folge. Aber die Dephosphorylierung von eEF-2 war deutlich stärker ausgeprägt als die von TnI oder PLB und die PKA-Expression in den transgenen Tieren war unverändert. Dies spricht für eine zielgerichtete Dephosphorylierung durch die überexprimierte PP2Ac. Eventuell sind nicht alle regulatorischen Untereinheiten der PP2A in Wildtyp-Mäusen an katalytische Untereinheiten gebunden und stehen somit als Reserve zur Verfügung und könnten die überexprimierten katalytischen Untereinheiten in den transgenen Mäusen binden. Die mittels ^{32}P -markierter Phosphorylase a gemessene PP2A-Aktivität stieg in den transgenen Herzen in einem geringeren Ausmaß an, als der Anstieg der Proteinexpression erwarten ließ. Diese Beobachtung könnte mit der Bindung des α_4 -Proteins an die PP2Ac erklärt werden. Interessanterweise kann α_4 direkt an die katalytische Untereinheit der PP2A binden und zwar ohne Beteiligung anderer Untereinheiten. Außerdem verändert die Bindung von α_4 an PP2Ac die Substratspezifität der PP2Ac mit einer im Vergleich zur Phosphorylase a stärkeren Affinität zum MBP, das zuvor von einer MAPK phosphoryliert wurde (Murata et al.

1997). Jedenfalls sollte die erhöhte PP2Ac-Aktivität zu einer Abnahme der Phosphorylierung und damit zu einer verminderten Funktion von z.B. PLB oder TnI führen, was in der Tat der Fall war. Auch der verminderte linksventrikuläre Druck bzw. dessen erste Ableitung in den PP2Ac-überexprimierenden Mäusen sprechen für eine gestörte Funktion kardialer regulatorischer Proteine. Die Überexpression der PP2Ac hatte keine Auswirkungen auf den Proteingehalt von wichtigen regulatorischen Proteinen des freien und junktionalen sarkoplasmatischen Retikulums wie PLB, SERCA und Calsequestrin. Aber der maximale Effekt einer β -adrenergen Stimulation war deutlich geringer in transgenen Herzen im Vergleich zu Wildtypen. Diese funktionellen Defekte spiegeln aber wahrscheinlich nicht ausschließlich eine verminderte Proteinphosphorylierung wider, sondern auch wie hier gezeigt zusätzliche funktionell relevante strukturelle Veränderungen in den transgenen Herzen wie Nekrosen und Fibrose. Denn eine reduzierte Phosphorylierung von PLB und TnI sollte durch eine verstärkte β -adrenerge Stimulation überwunden werden können. So wurde in Herzen mit PLB-Überexpression eine verminderte Kontraktilität gefunden, die aber durch maximale β -adrenerge Stimulation normalisiert werden konnte (Kadambi et al. 1996, Neumann et al. 1998). PP2A-Mäuse hielten einer Ligation der LAD zum Auslösen eines Infarktes besser stand als Wildtyp-Mäuse, was eventuell mit Veränderungen im Akt/GSK3/ β -Catenin-Signalweg im Zusammenhang stehen könnte (Höhn et al. 2015, Publikation 4.3). Ferner war in ihnen die Struktur der Myofilamente verändert.

5.5. PP1 und I-2

Publikation 4.14

Interessanterweise konnten die unerwünschten, funktionell schädigenden Effekte einer PP1-Überexpression im Herzen durch Hemmung der PP1-Aktivität mittels Überexpression von I-2¹⁴⁰ verhindert werden. Die Überexpression von PP1c hatte in früheren Arbeiten einen Anstieg der PP1-Aktivität zur Folge, die von einer verminderten PLB-Phosphorylierung an Serin-16 und einer verminderten kardialen Kontraktilität begleitet war (Carr et al. 2002). Das gentechnische Ausschalten (Knockout) von I-1, einem Protein, das nach PKA-abhängiger Phosphorylierung an Threonin-35 die PP1 hemmt, erhöhte die Phosphataseaktivität im Herzen, reduzierte die Kontraktionskraft sowie die Relaxation und schwächte die Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation in isolierten Herzen und in vivo (Carr et al. 2002). Entsprechend

ergab die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von I-1 oder I-2 eine erniedrigte Phosphataseaktivität, eine erhöhte PLB-Phosphorylierung an Serin-16 (in I-1- und I-2¹⁴⁰-überexprimierenden Mäusen) und Threonin-17 (in I-1- aber nicht in I-2¹⁴⁰-überexprimierenden Mäusen) sowie eine gesteigerte Kontraktilität (Kirchhefer et al. 2005, Pathak et al. 2005). In PKC α -knockout-Mäusen war die Kontraktilität erhöht und die PP1-Aktivität vermindert aufgrund einer vermehrten Wirksamkeit von I-1. Außerdem wurde eine höhere PLB-Phosphorylierung an Serin-16 beobachtet (Braz et al. 2004). Interessanterweise konnte der PKC α -Knockout den PP1-Phänotyp aufheben. Andererseits war die Überexpression von PKC α von einer reduzierten Kontraktilität, einer erhöhten PP1-Aktivität und einer erniedrigten PLB-Phosphorylierung begleitet (Braz et al. 2004). In einem Ratten-Modell bei dem durch Verengung der Aorta (Aortic banding) eine Herzinsuffizienz induziert wurde, konnte durch Gentransfer von aktivem I-1 die Herzfunktion zumindest teilweise wiederhergestellt werden (Pathak et al. 2005). Zusammenfassend scheint eine erhöhte PP1-Aktivität die Herzfunktion beeinträchtigen zu können. In dieser vorliegenden Arbeit beeinflusste eine selektive PP1-Hemmung durch I-2¹⁴⁰ nicht nur die Herzfunktion, die Herzhypertrophie und die Herzinsuffizienz positiv, sondern verminderte auch die durch PP1-Überexpression erhöhte Sterblichkeit der transgenen Tiere. Wie schon berichtet (Kirchhefer et al. 2005) könnten die günstigen funktionellen Effekte von I-2¹⁴⁰ einer gesteigerten PLB-Phosphorylierung sowie SERCA- und RyR-Expression zugeschrieben werden. Dies wäre mechanistisch von Bedeutung, da es Beweise gibt nach denen eine erhöhte SERCA-Aktivität positive Auswirkungen hat, sowohl in experimentellen wie genetischen Modellen der Herzinsuffizienz (del Monte et al. 2001, Minamisawa et al. 1999). Entsprechend kann die verminderte Herzfunktion in PP1-Mäusen nicht nur der reduzierten PLB-Phosphorylierung zugeschrieben werden, sondern auch der geringeren SERCA- und RyR-Expression. Die wiederhergestellte Funktion in doppelt transgenen Mäusen könnte trotz einer leichten Abnahme der RyR-Menge mit einer kompensatorischen Wirkung der dauerhaft erhöhten PLB-Phosphorylierung erklärt werden. Auch frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe mit zellmembranpermeablen natürlichen Hemmstoffen von Proteinphosphatasen wie Okadasäure und Cantharidin deuteten auf eine Rolle der PP1-Aktivität für die kardiale Kontraktilität. Die Behandlung von isolierten Herzpräparaten mit diesen Substanzen induzierte einen positiv inotropen Effekt, der von einer gesteigerten PLB-Phosphorylierung begleitet war (Neumann et al. 1993). Wie auch schon in der Einleitung erwähnt, haben Untersuchungen an menschlichen insuffizienten

Herzen Beweise für eine Bedeutung der PP1 in der Regulation der Herzfunktion geliefert. So war die PP1-Aktivität erhöht (Neumann et al. 1997) und die Phosphorylierung von I-1 vermindert (El-Armouche et al. 2004). Die erhöhte PP1-Aktivität könnte verschiedene Ursachen haben: Die PP1-Expression könnte erhöht sein; die I-1-Expression könnte vermindert sein (El-Armouche et al. 2004, 2003) oder auch die von I-2; die Phosphorylierung und somit die inhibitorische Wirkung von I-1 könnte reduziert sein (Carr et al. 2002); oder es ist eine Kombination dieser Ursachen. Eine Phosphorylierung von I-1 an Threonin-35 durch die PKA führt bekanntermaßen zu einer Zunahme der hemmenden Wirkung von I-1. Andererseits wird die I-1-Aktivität reduziert, wenn die Phosphorylierung von I-1 an Serin-67 stattfindet (Rodriguez et al. 2007, 2006). In Proben von insuffizienten menschlichen Herzen war die Phosphorylierung von I-1 an Serin-67 im Vergleich zu normalen Herzen erhöht, was zu einer erhöhten PP1-Aktivität führen könnte (Braz et al. 2004). Unabhängig von dem zugrunde liegenden Mechanismus für die gesteigerte PP1-Aktivität konnte in isolierten elektrisch gereizten Zellen aus insuffizienten menschlichen Herzen der Effekt einer β -adrenergen Stimulation auf Zellverkürzung und Ca^{2+} -Transienten dadurch normalisiert werden, indem man die Zellen mit einem Adenovirus infizierte, der eine konstitutiv aktive Mutante von I-1 exprimiert (Carr et al. 2002). Da die PP1-Aktivität in insuffizienten menschlichen Herzen erhöht ist und die Phosphorylierung von Proteinen, die an der Regulation der kontraktilen Funktion beteiligt sind, reduziert ist, könnte eine erhöhte PP1-Aktivität schädlich für die kardiale Kontraktilität sein. Passenderweise führte eine PP1-Überexpression im Mausherzen zu beeinträchtigter Kontraktilität, Herzhypertrophie und erhöhter Mortalität ab einem Alter von sechs Monaten (Carr et al. 2002). Auch diese Arbeit, die zeigt, wie eine Hemmung der PP1-Aktivität durch I-2¹⁴⁰ die schädlichen Effekte der PP1-Überexpression aufhebt, unterstützt diese Ansicht. Deshalb könnte eine pharmakologische Hemmung der PP1-Aktivität eine Therapiemöglichkeit bei der Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen. Jedoch sind noch weitere Arbeiten notwendig, um zu prüfen, ob eine PP1-Hemmung wirklich keine unerwünschten Effekte aufweist. Der Einsatz von aktuell zur Verfügung stehenden Substanzen scheint allerdings nicht durchführbar zu sein. So bewirkten Proteinphosphatase-Hemmstoffe wie z.B. Cantharidin in den Konzentrationen, die für einen positiv inotropen Effekt am Herzen notwendig sind, eine Konstriktion der Koronararterien beim Menschen (Knapp et al. 1999). Somit wären für einen klinischen Einsatz nur Substanzen geeignet, welche die PP1 speziell in den Herzmuskelzellen

hemmen. Dieselbe Einschränkung gilt auch für eine adenovirale Übertragung von I-2 auf das Herz. Wenn man ein Virus in die Koronararterien injizierte, würden wohl zunächst Endothelzellen und dann glatte Gefäßmuskelzellen infiziert werden, bevor der Virus die Herzmuskelzellen erreichte. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wäre die Herstellung eines Virus mit einem herzmuskelzellspezifischem Promoter. Die Überexpression von I-2¹⁴⁰ hat nützliche Auswirkungen auf die Herzfunktion und verhindert auf spezifische Weise eine Herzhypertrophie. Tatsächlich konnte eine PP1-induzierte Hypertrophie durch Kreuzung der PP1-Mäuse mit I-2¹⁴⁰-Mäusen verhindert werden, aber eine PP2A-induzierte Hypertrophie wurde durch I-2¹⁴⁰ nicht beeinflusst. Diese *in-vivo*-Befunde passen zu der bekannten Spezifität von I-2, das nur die PP1 hemmt und nicht die PP2A-Aktivität. Die hier präsentierten Daten haben deutlich den Nutzen einer Hemmung von genetisch erhöhter PP1-Aktivität durch I-2¹⁴⁰ gezeigt. Ob eine durch erhöhte PP1-Aktivität bereits gestörte Herzfunktion mittels PP1-Hemmung wiederhergestellt bzw. verbessert werden kann, ist noch nicht genauer untersucht worden. Immerhin konnte durch Applikation von I-2-Adenoviren in das Herz eines kardiomyopathischen Hamsters, ein nicht-transgenes Modell der Herzinsuffizienz, die Herzfunktion verbessert und die Mortalität gesenkt werden (Yamada et al. 2006). Ein Ansatz für zukünftige Untersuchungen wäre die Herstellung von transgenen Mäusen mit einer herzspezifischen induzierbaren Überexpression von I-2, die dann mit PP1-Mäusen gekreuzt werden könnten. Die Ergebnisse einer solchen Studie könnten Informationen liefern, ob die schädlichen Auswirkungen der PP1 auf die Herzfunktion wieder rückgängig gemacht werden können. Nichtsdestoweniger zeigen die hier dargestellten Ergebnisse: eine durch erhöhte PP1-Aktivität induzierte kardiale Dysfunktion kann durch zusätzliche Überexpression von I-2 im Säugerherzen verhindert werden.

5.6. Ca²⁺-Homöostase

Publikationen 4.4 und 4.5

In dieser Studie haben wir eine verminderte Expression von Junctin im insuffizienten menschlichen Herzen nachgewiesen. Um einen besseren Einblick in die Funktion von Junctin zu gewinnen, haben wir einen adenoviralen Ansatz verfolgt, um Junctin in isolierten Rattenkardiomyozyten überzuexprimieren. Dabei fanden wir reduzierte Ca²⁺-Transienten, einen verminderten Ca²⁺-Gehalt im sarkoplasmatischen Retikulum und eine abgeschwächte Kontraktilität der Kardiomyozyten. Im insuffizienten menschlichen

Herzen ist die Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum und/oder die Ca^{2+} -Freisetzung gestört. In vielen Studien, die mögliche Mechanismen der Herzinsuffizienz untersucht haben, wurde über eine verminderte Expression und/oder gestörte Funktion von SERCA2a, einem Protein des freien sarkoplasmatischen Retikulums berichtet (Hasenfuss et al. 1997, 1994). Weniger ist über die potentielle Rolle von Proteinen des junctionalen sarkoplasmatischen Retikulums für die Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung in der menschlichen Herzinsuffizienz bekannt. Die Expression des kardialen CSQ scheint streng reguliert zu sein, da die Proteinmengen auch bei Herzinsuffizienz unverändert blieben (Münch et al. 1998). Ein Verlust von CSQ oder dessen Funktion durch Mutationen im CSQ-Gen (CASQ2) wurde mit der Entstehung von Katecholamin-induzierten ventrikulären Tachyarrhythmien in Verbindung gebracht (Postma et al. 2002). Diese Form von Arrhythmien wurde auch bei CSQ-Knockout-Mäusen beobachtet. Aber überraschenderweise waren die Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten von CSQ-Knockout-Mäusen weitgehend unverändert (Knollmann et al. 2006). Hier haben wir zum ersten Mal eine verminderte Proteinexpression von Junctin (und Triadin) in der menschlichen Herzinsuffizienz gezeigt. Diese Herunterregulation war nicht das Ergebnis eines Muskelzellverlustes in den insuffizienten Herzen, da die CSQ-Expression unverändert war. Jedoch ist zur Zeit unklar, ob die reduzierte Expression von Junctin (oder Triadin) der Grund für die Herzinsuffizienz ist, oder ob es sich dabei um einen adaptiven Prozeß zum Erhalt der Ca^{2+} -Homöostase handelt. Triadin kann die Ca^{2+} -Freisetzung *in vivo* hemmen (Kirchhefer et al. 2002, Kirchhefer et al. 2004). Aber Triadin und/oder Junctin können auch die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR-Kanals erhöhen (Györke et al. 2004). Für Triadin wurde dies *in vitro* und in isolierten Kardiomyozyten gezeigt. Eine erhöhte Expression von Triadin in Herzmuskelzellen ergab reduzierte Ca^{2+} -Transienten und erhöhte Ca^{2+} -Spark-Frequenzen (Terentyev et al. 2005). Somit könnte eine Überexpression von Triadin das sarkoplasmatische Retikulum undicht für Ca^{2+} machen, was letztlich zu einem Verlust von zytosolischem Ca^{2+} und somit zu verminderter Kontraktilität führt. Eine verminderte Expression von Junctin im insuffizienten menschlichen Herzen könnte vor einem Ca^{2+} -Verlust aus dem sarkoplasmatischen Retikulum schützen und wäre somit vorteilhaft für die Herzfunktion. Daher könnte die Herunterregulation von Junctin eine Anpassung des Herzen darstellen, z.B. bei chronischer β -adrenergischer Stimulation. Diese Hypothese wird durch ein transgenes Mausmodell der Herzinsuffizienz unterstützt, bei dem die herzspezifische Überexpression des β_1 -Adrenozeptors von einer verminderten

Expression von Junctin begleitet war (Engelhardt et al. 2001). Zusätzlich können Störungen des intrazellulären Transportes junktionaler SR-Proteine und des Aufbaus des Ca^{2+} -Freisetzungskomplexes zu einer gestörten Ca^{2+} -Freisetzung führen und zur Herzinsuffizienz beitragen (Kiarash et al. 2004, O'Brian et al. 2002). Basierend auf den Untersuchungsergebnissen an insuffizienten menschlichen Herzen und anderen Modellen der Herzinsuffizienz könnte eine erhöhte Menge an Junctin relativ zum RyR eine abgeschwächte Ca^{2+} -Freisetzung und verminderte Kontraktilität zur Folge haben. Hier präsentieren wir Daten von Junctin-überexprimierenden Rattenkardiomyozyten, die diese Hypothese unterstützen. Frühere Untersuchungen an transgenen Mäusen mit konstitutiver herzspezifischer Überexpression von Junctin ergaben einen unterschiedlich starken Grad der Herzhypertrophie, eine verminderte Kontraktilität, eine veränderte Genexpression und eine gestörte Relaxation (Hong et al. 2002, Kirchhefer et al. 2003, Zhang et al. 2001). In Herzen von Junctin-überexprimierenden Mäusen war der Proteingehalt von RyR und Triadin reduziert (Kirchhefer et al. 2003, Zhang et al. 2001). Der kardiale Phänotyp war außerdem Gendosis-abhängig, was an transgenen Mausmodellen mit entweder 10- oder 30-facher Überexpression von Junctin gezeigt wurde. In Kardiomyozyten mit 10-facher Überexpression von Junctin waren einige morphologische Veränderungen sichtbar: die Assoziation von sarkoplasmatischem Retikulum und T-Tubuli war verstärkt und die Anordnung von CSQ war beeinträchtigt (Zhang et al. 2001). Mit deutlich höherer Überexpression (30-fach) war der Phänotyp wesentlich ausgeprägter: die transgenen Mäuse zeigten eine kardiale Hypertrophie, Bradykardie, Vorhofflimmern und Fibrose (Hong et al. 2002). Diese Beobachtungen spiegeln nicht nur die primären Effekte einer Junctin-Überexpression wider, sondern auch sekundäre Effekte wie die Folgen von Hypertrophie und/oder kompensatorischen Veränderungen im Genexpressionsmuster (z.B. reduzierte Expression von Triadin und RyR). In unserer Studie haben wir einen adenoviralen Ansatz zur kurzzeitigen Überexpression von Junctin in isolierten Kardiomyozyten gewählt, um adaptive Veränderungen der Zellen zu minimieren und die molekulare Funktion dieses Proteins besser analysieren zu können. In den oben erwähnten transgenen Tiermodellen gab es die gemeinsame Beobachtung eines veränderten Expressionsmusters von Proteinen des sarkoplasmatischen Retikulums. Diese Regulationsmechanismen scheinen sinnvoll, um die Ca^{2+} -Homöostase aufrecht zu erhalten (Jones et al. 1998, Kirchhefer et al. 2001, Zhang et al. 2001). Im Gegensatz dazu führte die adenovirale Methode zwei Tage nach Infektion zu einer 2-fachen Überexpression von Junctin, ohne dabei den Gehalt anderer

Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums, wie z.B. Triadin und CSQ, zu beeinflussen. Jedoch konnte keine Aussage über eventuelle Veränderungen der RyR-Expression gemacht werden, da die RyR-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze unserer Testmethode lagen. Die mit dem Junctinvirus infizierten Kardiomyozyten wiesen verminderte Ca^{2+} -Transienten und einen verminderten Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums auf, sowie reduzierte Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten. In einer anderen Studie reduzierte die adenovirale Überexpression von Triadin ebenfalls die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten. Außerdem war die Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR-Kanäle erhöht, was in diesem Modell zu einem erniedrigten Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums führte (Terentyev et al. 2005). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen waren die Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten von Junctin-überexprimierenden transgenen Mäusen unverändert, aber der Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums war ebenfalls vermindert (Kirchhefer et al. 2003). Wie schon erwähnt könnten in transgenen Mäusen kompensatorische Mechanismen wie eine Herabregulation anderer Proteine vorkommen, um den Veränderungen, die ihre Ursache in der Überexpression des Transgens haben, entgegen zu wirken. Damit können Unterschiede im Ca^{2+} -Handling zwischen transgenen Tiermodellen und dem hier benutzten Zellkulturmodell erklärt werden. Ein anderes, mehr generelles Problem von allen Überexpressionsmodellen scheint die subzelluläre Verteilung des Transgens zu sein. Ein falsches Targeting des Transgens könnte unspezifische Nebeneffekte hervorrufen, insbesondere wenn der Grad der Überexpression hoch ist. Da Junctin nur in einem stabilen quaternären Komplex zusammen mit Triadin, CSQ und RyR aktiv zu sein scheint und hier der Grad der Überexpression mit 2-fach relativ niedrig war, sind unspezifische Effekte der Junctin-Überexpression eher unwahrscheinlich, können aber natürlich nicht ausgeschlossen werden. Bekanntermaßen kann ein Komplex aus CSQ, Triadin und/oder Junctin wahrscheinlich die luminalen Ca^{2+} -Sensitivität des RyR vermitteln (Györke et al. 2004). In allen bisher publizierten Studien führten genetisch induzierte Veränderungen des Gehaltes von entweder CSQ, Triadin oder Junctin innerhalb des Ca^{2+} -Freisetzungskomplexes im sarkoplasmatischen Retikulum zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase. Die molekularen Mechanismen scheinen aber für jedes Modell anders zu sein. Wir haben eine verminderte Expression von Junctin und Triadin in der menschlichen Herzinsuffizienz dargestellt, möglicherweise als Adaption an einen erniedrigten Ca^{2+} -Gehalt oder an eine erhöhte Ca^{2+} -Undichtigkeit des

sarkoplasmatischen Retikulums. Mit Hilfe einer adenoviralen Überexpression von Junctin haben wir den Einfluß einer veränderten Zusammensetzung des junctionalen Proteinkomplexes auf den Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums, auf das zytosolische Ca^{2+} und auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten demonstriert. Inzwischen wurde auch der Phänotyp einer Junctin-Knockout-Maus publiziert (Yuan et al. 2007). Dort bewirkte der Verlust von Junctin vergrößerte Ca^{2+} -Transienten. Somit sind diese Daten komplementär mit unseren Ergebnissen. Die verminderte oder fehlende Expression von Junctin bei der menschlichen Herzinsuffizienz könnte mithin einen Kompensationsmechanismus darstellen.

6. AUSBLICK

Für klinische Anwendungen könnte man somit fragen, ob es möglich wäre, die hier beschriebenen Befunde umzusetzen.

Vorstellbarerweise könnten Derivate von Adenosin oder ATP- die positiv inotropen Effekte dieser Stoffe selektiv sich zu Nutze machen. Dies wäre denkbar für die kurzfristige Anwendung in der Intensivstation, um das Herzzeitvolumen bei terminaler Herzinsuffizienz aufrecht zu erhalten.

Es gibt Bemühungen, mutierten I-1 viral direkt in die Koronarien von Patienten zu injizieren (Prof Kranias in Cinninnati besitzt dazu ein Patent (Haghighi et al. 2014; <https://patents.justia.com/inventor/evangelia-kranias>). Probleme hierbei sind die hohen Virusmengen, die nach tierexperimentellen Daten notwendig sind und Abstoßungsreaktionen (Naso et al. 2017; Penny und Hammond 2017). Zumindest Abstoßungsreaktionen sind mit viralen Transportsystemen für Gene überwindbar, wie die CUPID 2 Studie gezeigt hat (Greenberg et al. 2016). Ob das eingeschleuste I-1 Gen aber längere Zeit aktiv sein wird, kann kritisch beurteilt werden und stellt eine hohe Hürde für die Translation dieser Art von Forschungen in die Klinik dar.

Analog wird unsere Arbeitsgruppe versuchen die Aktivität von PP2A im Herzen über gentechnische Versuche mit SET, einem spezifischen Protein-Inhibitor von PP2A zu verändern. Langfristig wäre auch hier die Hypothese, eine Gentherapie am Menschen anbieten zu können.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die wesentlichen neuen Entdeckungen der hier präsentierten Arbeiten können wie folgt zusammengefaßt werden:

Wir haben die Synthese von 5-HT im Herzen und die mRNA-Expression und Funktion von 5-HT-Rezeptoren sowie ihre Signaltransduktion in rechtem Vorhofgewebe von Patienten mit Bypassoperation und zum Teil auch in rechtem Ventrikelgewebe von menschlichen Spenderherzen untersucht. In rechten Vorhofpräparaten hatte 5-HT einen positiv inotropen und lusitropen Effekt, der durch einen 5-HT₄-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden konnte. 5-HT erhöhte den cAMP-Gehalt im Vorhof aber veränderte nicht den Gewebegehalt von IP₃. Es konnten mRNAs für die 5-HT₄-Rezeptorspleißvarianten 5-HT_{4(a)}, 5-HT_{4(b)} und 5-HT_{4(c)} im menschlichen rechten Vorhof und Ventrikel nachgewiesen werden. 5-HT_{2A}-mRNA war nur im Vorhof meßbar. Die 5-HT₄-mRNA-Menge im rechten Ventrikel war geringer als die im rechten Vorhof. Im Vorhof erhöhte 5-HT die Phosphorylierung von Phospholamban sowie die von Troponin-I. Zusammenfassend werden die positiv inotropen und lusitropen Effekte von 5-HT in rechten Vorhöfen des Menschen über 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt.

Die kumulative Gabe von ATP führte an menschlichen Vorhofpräparaten zunächst zu einer schnellen Abnahme der Kontraktionskraft (negativ inotroper Effekt) gefolgt von einem eher langsamen aber anhaltenden Anstieg der Kontraktionskraft (positiv inotroper Effekt). Hemmstoffe der Phospholipase C und Adenylylzyklase beeinflussten die Effekte von ATP nicht. Versuche mit aktuell verfügbaren subtypspezifischen Purinozeptor-Agonisten und -Antagonisten deuteten eventuell auf die Beteiligung eines P_{2X4}-Rezeptors am positiv inotropen Effekt hin. Welcher Rezeptor für den initialen negativ inotropen Effekt von ATP verantwortlich ist, bleibt zu ergründen. Zusammenfassend beschreiben wir einen biphasischen Effekt von ATP auf die Kontraktionskraft des isolierten menschlichen Vorhofs. Möglicherweise spielt ATP eine physiologische Rolle im menschlichen Herzen, zum Beispiel nach einer Schädigung könnte die Kontraktilität aufrechterhalten werden.

Auch die Wirkung von Adenosin im menschlichen Vorhof ist von klinischer Relevanz, z.B. um supraventrikuläre Arrhythmien zu behandeln. Wir haben den Effekt von Adenosin auf die Kontraktionskraft von isolierten elektrisch gereizten rechten Vorhofpräparaten gemessen. Bekanntlich kann Adenosin über A₁-Adenosinrezeptoren

negativ inotrope Effekte am menschlichen Vorhof ausüben. Nach unseren Befunden war bei etwa 25% der untersuchten Patienten zusätzlich ein positiv inotroper Effekt von Adenosin meßbar, der durch einen A₁-Adenosinrezeptorantagonisten abgeschwächt werden konnte. Somit scheint zumindest bei einigen Patienten Adenosin über A₁-Adenosinrezeptoren zu einem bisher nicht bemerkten positiv inotropen Effekt führen zu können.

Die reversible Proteinphosphorylierung ist ein essentieller Mechanismus für zahlreiche zelluläre Funktionen. Im Gegensatz zu Proteinkinasen ist die Funktion und Regulation der Proteinphosphatasen noch immer weitgehend ungeklärt. Um dieses Thema genauer zu untersuchen, haben wir transgene Mäuse hergestellt, welche die katalytische Untereinheit der PP2A im Herzen überexprimieren. Die Phosphorylierung von Phospholamban, Troponin-I und eukaryontischem Elongationsfaktor 2 war vermindert. Wenngleich keine erhöhte Sterblichkeit beobachtet wurde, so entwickelten die transgenen Mäuse eine Herzhypertrophie, eine ventrikuläre Dilatation und eine verminderte kardiale Kontraktilität, die Ähnlichkeiten zu einigen menschlichen Formen der Herzinsuffizienz aufwies. Interessanterweise waren PP2A-Mäuse resistenter gegen einen experimentellen Infarkt als Wildtyp-Mäuse. Zusammengefaßt deuten die Befunde auf eine bedeutende Rolle der PP2A für die Funktion des Herzens hin. Störungen in der Proteinphosphataseexpression könnten mithin zu Herzerkrankungen führen bzw. könnten diese verstärken. So führte auch die herzspezifische Überexpression der PP1 in Mäusen zu Herzhypertrophie, verschlechterter Kontraktilität, Herzinsuffizienz und vorzeitigem Tod. Wurden diese Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die eine trunkierte aber aktive Form des PP1-Inhibitors I-2 überexprimieren, waren sämtliche Effekte der PP1-Überexpression wie erhöhte Proteinphosphataseaktivität, verminderte kardiale Kontraktilität, erhöhtes Herzgewicht, kardiale Fibrose sowie erhöhte altersabhängige Sterblichkeit bei den Doppelt-transgenen Mäusen wieder normalisiert. Diese Ergebnisse zeigen den schädlichen Einfluß einer erhöhten PP1-Aktivität auf das Herz und die potentiell pathophysiologische Rolle dieses Enzyms bei der menschlichen Herzinsuffizienz.

Junctin ist ein Transmembranprotein, das im Bereich des kardialen junktionalen sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und dort einen quaternären Komplex mit dem Ca²⁺-Freisetzungskanal, Triadin und Calsequestrin bildet. Gestörte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen dieses Komplexes können die Ca²⁺-Sensitivität des Ca²⁺-Freisetzungskanals verändern und können zu kardialer

Dysfunktion einschließlich Herzhypertrophie, verminderter Kontraktilität und gestörten Ca^{2+} -Transienten führen. Um die Bedeutung von Junctin für die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase und der Herzmuskelzellkontraktion besser zu verstehen, haben wir mit Hilfe eines rekombinanten Adenovirus Junctin in isolierten Rattenkardiomyozyten überexprimiert. Die Ca^{2+} -Transienten der infizierten Zellen zeigten eine reduzierte Ca^{2+} -Amplitude und die Kontraktilität war vermindert. Unseren Ergebnisse zufolge ist eine erhöhte Expression von Junctin mit einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase assoziiert. Außerdem haben wir eine verminderte Expression von Junctin und Triadin in der menschlichen Herzinsuffizienz nachgewiesen, was möglicherweise eine Adaption an einen erniedrigten Ca^{2+} -Gehalt oder an eine erhöhte Ca^{2+} -Undichtigkeit des sarkoplasmatischen Retikulums darstellt.

8. LITERATUR

- Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, Cantiello HF (1993) The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 312-316
- Azim S, Banday AR, Tabish M (2012) Identification of alternatively spliced multiple transcripts of 5-hydroxytryptamine receptor in mouse. *Brain Res Bull* 87: 250-258
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001) 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363: 146-160
- Baharians Z, Schönthal AH (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem* 273: 19019-19024
- Banfi C, Ferrario S, De Vincenti O, Ceruti S, Fumagalli M, Mazzola A, D' Ambrosi N, Volonte C, Fratto P, Vitali E, Burnstock G, Beltrami E, Parolari A, Polvani G, Biglioli P, Tremoli E, Abbracchio MP (2005) P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNFalpha and potential role in myocardial cell death. *J Mol Cell Cardiol* 39: 929-939
- Bardenheuer H, Whelton B, Sparks HV Jr (1987) Adenosine release by the isolated guinea pig heart in response to isoproterenol, acetylcholine, and acidosis: the minimal role of vascular endothelium. *Circ Res* 61: 594-600
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157: 171-179
- Behnke N, Müller W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Stein B (1990) Differential antagonism by 1,3-dipropylxanthine-8-cyclopentylxanthine and 9-chloro-2-(2-furanyl)-5,6-dihydro-1,2,4-triazolo (1,5-c)quinazolin-5-imine of the effects of adenosine derivatives in the presence of isoprenaline on contractile response and cAMP content in cardiomyocytes. Evidence for the coexistence of A1- and A2-adenosine receptors on cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 1017-1023
- Belardinelli L, Isenberg G (1983) Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. *Am J Physiol* 244: H734-H737
- Benfey BG, Cohen J, Kunos G, Vermes-Kunos I (1974) Dissociation of 5-hydroxytryptamine effects on myocardial contractility and cyclic AMP accumulation. *Br J Pharmacol* 50: 581-585
- Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204: 317-322

- Bers DM (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocytes contraction. *Circ Res* 87: 275-281
- Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- Bers DM (2014) Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol* 76: 107-127
- Bers DM, Eisner DA, and Valdivia HH (2003) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and heart failure. Roles of diastolic leak and Ca^{2+} transport. *Circ Res* 93: 487-490
- Birkeland JA, Swift F, Tovsrud N, Enger U, Lunde PK, Qvigstad E, Levy FO, Sejersted OM, Sjaastad I (2007) Serotonin increases L-type Ca^{2+} current and SR Ca^{2+} content through 5-HT₄ receptors in failing rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2367-2376
- Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1998) Cloning, expression and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine₄ receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* 70: 2252-2261
- Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclere S, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1997) Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Letters* 412: 465-474
- Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 375: 129-133
- Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martin-Satué M, Marsal J, Solsona C (2000) ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem* 275: 20268-20273
- Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PAW (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96: 1495-1500
- Böhm M, Brückner R, Hackbarth I, Haubitz B, Linhart R, Meyer W, Schmidt B, Schmitz W, Scholz H (1984) Adenosine inhibition of catecholamine-induced increase in force of contraction in guinea pig atrial and ventricular heart preparations. Evidence against a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent effect. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 483-492
- Böhm M, Brückner R, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J (1986) Role of guanine nucleotide-binding protein in the regulation by adenosine of cardiac potassium conductance and force of contraction. Evaluation with pertussis toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332: 403-405
- Böhm M, Pieske B, Ungerer M, Erdmann E (1989) Characterization of A1 adenosine receptors in atrial and ventricular myocardium from diseased human hearts. *Circ Res* 65: 1201-1211

- Boknik P, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Wenzlaff H (1997) Characterization of biochemical effects of CGS 21680C, an A₂-adenosine receptor agonist, in the mammalian ventricle. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 750-758
- Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term β -adrenergic stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 262: 222-231
- Borst MM, Schrader J (1991) Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ Res* 68: 797-806
- Bowditch J, Brown AK, Dow JW (1985) Accumulation and salvage of adenosine and inosine by isolated mature cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* 844: 119-128
- Bowler JW, Bailey RJ, North RA, Surprenant A (2003) P2X₄, P2Y₁ and P2Y₂ receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 140: 567-575
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brandt H, Lee EYC, Killilea SD (1975) A protein inhibitor of rabbit liver phosphorylase phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 63: 950-956
- Brattelid T, Kvingedal AM, Krobert KA, Andressen KW, Bach T, Hystad ME, Kaumann AJ, Levy FO (2004a) Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT₄ receptor splice variant, 5-HT_{4(i)}. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 616-628
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Kaumann AJ (2004b) Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370: 157-166
- Brattelid T, Qvigstad E, Birkeland JA, Swift F, Bekkevold SV, Krobert KA, Sejersted OM, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Sjaastad I (2007) Serotonin responsiveness through 5-HT_(2A) and 5-HT₍₄₎ receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 43: 767-779
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkenstein JD (2004) PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 10: 248-254
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211

- Brodde OE, Zerkowski HR, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schäfer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, Oelert H (1995) Age-dependent changes in the beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 26:20-26
- Brüchert N, Boknik P, Gergs U, Kirchhefer U, De Paoli-Roach A A, Schmitz W, Neumann J (2004) Comparison of the effect of I-2 in vivo on PP1- or PP2A-induced cardiac hypertrophy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl. 1): R91 (abstract)
- Brüchert N, Mavila N, Boknik P, Baba HA, Fabritz L, Gergs U, Kirchhefer U, Kirchhof P, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J (2008) Inhibitor-2 prevents protein phosphatase 1-induced cardiac hypertrophy and mortality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4): H1539-H1546
- Brückner R, Fenner A, Meyer W, Nobis TM, Schmitz W, Scholz H (1985) Cardiac effects of adenosine and adenosine analogs in guinea-pig atrial and ventricular preparations: evidence against a role of cyclic AMP and cyclic GMP. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 766-774
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581
- Burnstock G (2017) Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 8: 661
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-688
- Burnstock G, Meghji P (1981) Distribution of P1- and P2-purinoceptors in the guinea-pig and frog heart. *Br J Pharmacol* 73: 879-885
- Burnstock G, Pelleg A (2015) Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signal* 11: 1-46
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breiden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22: 4124-4135
- Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 24: 371-381
- Chen MJ, Dixon JE, Manning G (2017) Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* 10(474): pii: eaag1796
- Chen YH, Chen MX, Alessi DR, Campbell DG, Shanahan C, Cohen P, Cohen PT (1994) Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 356: 51-55
- Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Etensohn K, Pfeifer K, Akin B, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2007) Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak independent of luminal Ca²⁺ and trigger ventricular arrhythmias in mice. *Circ Res* 101: 617-626

- Chopra N, Yang T, Asghari P, Moore ED, Huke S, Akin B, Cattolica RA, Perez CF, Hlaing T, Knollmann-Ritschel BE, Jones LR, Pessah IN, Allen PD, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2009) Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca^{2+} release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7636-7641
- Christ T, Rozmaritsa N, Engel A, Berk E, Knaut M, Metzner K, Canteras M, Ravens U, Kaumann A (2014) Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 11193-11198
- Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G (1996) Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16: 2495-2507
- Corriden R, Insel PA (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3: re1
- Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15735-15740
- Danielsen W, v der Leyen H, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Doring V, Kalmar P (1989) Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 14: 171-173
- Davare MA, Horne MC, Hell JW (2000) Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275: 39710-39717
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel Cav1.2. *Science* 293: 98-101
- Day HJ, Holmsen H (1971) Concepts of the blood platelet release reaction. *Ser Haematol* 4: 3-27
- del Monte F, Hajjar RJ, Harding SE (2001) Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. *Circ Res* 88: E66-E67
- DePaoli-Roach AA (2003) Protein phosphatase 1 binding proteins. In: *Handbook of Cellular Signaling*, edited by Bradshaw RA and Dennis ED, San Diego Academic Press: 613-619
- Dobson JG Jr (1978) Reduction by adenosine of the isoproterenol-induced increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation and glycogen phosphorylase activity in rat heart muscle. *Circ Res* 43: 785-792
- Dobson JG Jr (1983) Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart. *Circ Res* 52: 151-160

- Docherty JR (1988) Investigations of cardiovascular 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 1-8
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237
- duBell WH, Lederer WJ, Rogers TB (1996) Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 493: 793–800
- duBell WH, Gigena MS, Guatimosim S, Long X, Lederer WJ, Rogers TB (2002) Effects of PP1/PP2A inhibitor calyculin A on the E-C coupling cascade in murine ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H38-H48
- duBell WH, Rogers TB (2004) Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca^{2+} current in mouse cardiac myocytes. *J Physiol* 556: 79–93
- Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H, Okada Y (2004) Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J Physiol* 559: 799-812
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Com* 346: 700–706
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittköpper K, Peeck M, Eschenhagen T (2007) Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart. *Eur J Heart Fail* 9: 1077-1080
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T (2004) Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61: 87-93
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J* 17: 437-439
- Endoh M, Maruyama M, Taira N (1983) Modification by islet-activating protein of direct and indirect inhibitory actions of adenosine on rat atrial contraction in relation to cyclic nucleotide metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 5: 131-142
- Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, and Hein L (2001) Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the β 1-adrenergic receptor. *FASEB J* 15: 2718-2720
- Everett AD, Stoops TD, Nairn AC, Brautigan D (2001) Angiotensin II regulates phosphorylation of translation elongation factor-2 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H161-H167

- Fabiato A, Fabiato F (1978) Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 276: 233-255
- Fabritz L, Kirchhof P, Fortmüller L, Auchampach JA, Baba HA, Breithardt G, Neumann J, Boknik P, Schmitz W (2004) Gene dose-dependent atrial arrhythmias, heart block and atrial cardiomyopathy in mice overexpressing the A₃-adenosine receptor. *Cardiovasc Res* 62: 500-508
- Fan GC, Yuan Q, Zhao W, Chu G, Kranias EG (2007) Junctin is a prominent regulator of contractility in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 617-622
- Fischer Y, Becker C, Loken C (1999) Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 274: 755-761
- Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, Parekh A, Kluxen FW, Kalkman HO, Stühmer W, Lübbers H (1992) Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus receptor. *EMBO J* 11:3481-3487
- Foulkes JG, Cohen P (1979) The hormonal control of glycogen metabolism. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to adrenaline. *Eur J Biochem* 97: 251-256
- Fountain SJ, North RA (2006) A C-terminal lysine that controls human P2X₄ receptor desensitization. *J Biol Chem* 281: 15044-15049
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-156
- Froldi G, Pandolfo L, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, Fassina G (1994) Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 381-386
- Gerald C, Adham N, Kao HT, Ohlsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1995) The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J* 12: 2806-2815
- Gergs U, Bock P, Fischer M, Hauptmann S, Neumann J (2010) Deletion of cardiac calsequestrin in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 381 (Suppl 1): 51 (Abstract)
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-40834
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Illes P, Neumann J (2007) ATP modified contraction in the human heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375 (Suppl. 1): 63 (Abstract)
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1716-1723

- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2009a) A positive inotropic effect of adenosine in cardiac preparations of right atria from diseased human hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 533-540
- Gergs U, Fahrion CM, Bock P, Fischer M, Wache H, Hauptmann S, Schmitz W, Neumann J (2017) Evidence for a functional role of calsequestrin 2 in mouse atrium. *Acta Physiol (Oxf)* 219: 669-682
- Gergs U, Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, Lär S (2009b) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄ receptors in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 349-359
- Ginsburg KS, Bers DM (2004) Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca²⁺ load and Ca²⁺ current trigger. *J Physiol* 556: 463-480
- Götz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W (1998) Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12370-12375
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM (2016) Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* 387(10024): 1178-1186
- Grote-Wessels S, Buchwalow I, Fabritz L, Zimmermann N, Schmitz W, Müller FU, Boknik P (2007) Functional studies in mice overexpressing A_{2A} adenosine receptors in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375(Suppl 1): 59 (Abstract)
- Guest PC, Salim K, Skynner HA, George SE, Bresnick JN, McAllister G (2000) Identification and characterization of a truncated variant of the 5-hydroxytryptamine_(2A) receptor produced by alternative splicing. *Brain Res* 876: 238-244
- Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN (2003) Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2373-H2381
- Gupta RC, Neumann J, Durant P, Watanabe AM (1993a) A₁-adenosine-receptor mediated inhibition of isoproterenol-stimulated protein phosphorylation in ventricular myocytes. Evidence against a cyclic AMP-dependent effect. *Circ Res* 72: 65-74
- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM (1993b) Comparison of adenosine and muscarinic receptor mediated effects on phosphatase inhibitor-1 activity in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 16-22

- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M, Sabbah HN (1996) Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol* 270: H1159-H1164
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S (2004) The role of calsequestrin, Triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* 86: 2121-2128
- Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77: 160-167
- Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske B, Just H (1997) Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92: 87-93
- Hasenfuss G, Pieske B (2002) Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34: 951-969
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 434-442
- Hastie CJ, Cohen PT (1998) Purification of protein phosphatase 4 catalytic subunit: inhibition by the antitumour drug fostriecin and other tumour suppressors and promoters. *FEBS Lett* 431: 357-361
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514
- Headrick JP, Ashton KJ, Rose'meyer RB, Peart JN (2013) Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther* 140: 92-111
- Heijman J, Ghezelbash S, Wehrens XH, Dobrev D (2017) Serine/Threonine Phosphatases in Atrial Fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 103: 110-120
- Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210
- Hirano Y, Abe S, Sawanobori T, Hiraoka M (1991) Arachidonic acid induced increase in intracellular free calcium in guinea-pig hepatocytes. *Jpn J Physiol* 41: 327-332
- Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, Oike M (2002) Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* 119: 511-520
- Holmes CFB, Campbell DG, Caudwell FB, Aitken A, Cohen P (1986) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Primary structure of inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 155: 173-182
- Hong CS, Cho MC, Kwak YG, Song CH, Lee YH, Lim JS, Kwon YK, Chae SW, Kim DH (2002) Cardiac remodeling and atrial fibrillation in transgenic mice overexpressing junctin. *FASEB J* 16: 1310-1312

- Hood AR, Ai X, Pogwizd SM (2017) Regulation of cardiac gap junctions by protein phosphatases. *J Mol Cell Cardiol* 107: 52-57
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard J R, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane E J, Saxena PR, Humphrey PPA (1994) IUPHAR classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46: 157-203
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533-554
- Hu B, Mei QB, Yao XJ, Smith E, Barry WH, Liang BT (2001) A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X4 receptor. *FASEB J* 15: 2739-2741
- Huang FL, Glinsmann WH (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70: 419-426
- Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353: 417-439
- Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PP (2000) Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *Br J Pharmacol* 129: 388-394
- Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 101: 1385–1393
- Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30787–30796
- Jorgensen S (1956) Breakdown of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides in human plasma. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 12: 294-302
- Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW 2nd, Walsh RA, Kranias EG (1996) Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest* 97: 533-539
- Kaumann AJ (1991) 5-HT₄-like receptors in mammalian atria. *J Neural Transm* 34: 195-201
- Kaumann AJ (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *TIPS* 15: 451-455
- Kaumann AJ, Birnbaumer L (1974) Prostaglandin E1 action on sinus pacemaker and adenylyl cyclase in kitten myocardium. *Nature* 251: 515-517
- Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111: 674-706
- Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM (1996) Comparison of the densities of 5-HT₄ receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353: 592-595

- Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic β -adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349: 331-337
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100: 879-885
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1991) A 5-HT₄-like receptor in human right atrium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 150-159
- Kennedy C, Qi AD, Herold CL, Harden TK, Nicholas RA (2000) ATP, an agonist at the rat P2Y(4) receptor, is an antagonist at the human P2Y(4) receptor. *Mol Pharmacol* 57: 926-931
- Kennedy C (2005) P2X receptors: targets for novel analgesics? *Neuroscientist* 11: 345-356
- Kiarash A, Kellya CE, Phinneyb BS, Valdiviac HH, Abramsd J, Cala SE (2004) Defective glycosylation of calsequestrin in heart failure. *Cardiovasc Res* 63: 264-272
- Kichenin K, Decollogne S, Angignard J, Seman M (2000) Cardiovascular and pulmonary response to oral administration of ATP in rabbits. *J Appl Physiol* 88: 1962-1968
- Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J (2005) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68: 98-108
- Kirchhefer U, Baba HA, Kobayashi YM, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2002) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1334-H1343
- Kirchhefer U, Jones LR, Begrow F, Boknik P, Hein L, Lohse MJ, Riemann B, Schmitz W, Stypmann J, Neumann J (2004) Transgenic triadin 1 overexpression alters SR Ca²⁺ handling and leads to a blunted contractile response to β -adrenergic agonists. *Cardiovasc Res* 62: 122-134
- Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing Triadin 1. *J Biol Chem* 276: 4142-4149
- Kirchhefer U, Neumann J, Bers DM, Buchwalow IB, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovasc Res* 59: 369-379
- Kirchhof P, Fabritz L, Fortmüller L, Matherne G, Lankford A, Baba HA, Schmitz W, Neumann J, Boknik P (2003) Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A1 adenosine receptor. *Am J Physiol* 285: H145-H153
- Kirchhof P, Fabritz L, Kilic A, Begrow F, Breithardt G, Kuhn M (2004) Ventricular arrhythmias, increased cardiac calmodulin kinase II expression, and altered repolarization kinetics in ANP receptor deficient mice. *J Mol Cell Cardiol* 36: 691-700

- Knapp J, Boknik P, Deng MC, Huke S, Gombosova I, Klein-Wiele O, Linck B, Lüss H, Müller FU, Nacke P, Scheld HH, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1999) On the contractile function of phosphatases in isolated human coronary arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 464-472
- Knight JDR, Choi H, Gupta GD, Pelletier L, Raught B, Nesvizhskii AI, Gingras AC (2017) ProHits-viz: a suite of web tools for visualizing interaction proteomics data. *Nat Methods* 14: 645-646
- Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 116: 2510-2520
- Knudson CM, Stang KK, Moomaw CR, Slaughter CA, Campbell KP (1993) Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* 268: 12646-12654
- Kobayashi YM, Alseikhan A, Jones LR (2000) Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. *J Biol Chem* 275: 17639–17646
- Kobayashi YM, Jones LR (1999) Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* 274: 28660–28668
- Köhn M (2017) Miklós Bodanszky Award Lecture: Advances in the selective targeting of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A with peptides. *J Pept Sci* 23: 749-756
- Kranias EG, Hajjar RJ (2012) Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res* 110: 1646-1660
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T (1986) On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch* 407: 264-274
- Kuzmin AI, Lakomkin VL, Kapelko VI, Vassort G (1998) Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. *Am J Physiol* 275: C766-C771
- Läer S, Neumann J, Remmers F, Scholz H (1998a) Comparison of functional coupling and mRNA expression of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human and rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358 (Suppl. 1): R632 (Abstract)
- Läer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Müller FU, Neumann J (1998b) Receptor mechanism involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol* 123: 1182-1188
- Langer M, Lüttecke D, Schlüter KD (2003) Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 447: 289-297

- Legssyer A, Poggioli J, Renard D, Vassort G (1988) ATP and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol trisphosphate production in rat heart. *J Physiol* 401: 185-199
- Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A (2007) Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT₄ receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 218-224
- Lim HW, Molkenkin JD (1999) Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* 5: 246-247
- Linden J, Hollen CE, Patel A (1985) The mechanism by which adenosine and cholinergic agents reduce contractility in rat myocardium. Correlation with cyclic adenosine monophosphate and receptor densities. *Circ Res* 56: 728-735
- Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W, Gershon MD (2005) Expression and function of 5-HT₄ receptors in the mouse enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G1148-G1163
- Liu Q, Hofmann PA (2003) Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A₁ receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H97-103
- Ljubojevic S, Bers DM (2015) Nuclear calcium in cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 65: 211-217
- Lohmann K (1929) Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 17: 624-625
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lubbers ER, Mohler PJ (2016) Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 101: 127-133
- Mantelli L, Amerini S, Filippi S, Ledda F (1993) Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. *Br J Pharmacol* 109: 1268-1271
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-376
- Mayr GW, Thieleczek R (1991) Masses of inositol phosphates in resting and tetanically stimulated vertebrate skeletal muscles. *Biochem J* 280: 631-640
- Mei Q, Liang BT (2001) P₂ purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H334-H341
- Metra M, Teerlink JR (2017) Heart failure. *Lancet* 390(10106): 1981-1995
- Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias EG, Giles WR, Chien KR (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99: 313-322

- Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN (2002) Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 21: 366-373
- Mitchell RD, Simmerman HK, Jones LR (1988) Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 263: 1376-1381
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93: 215-228
- Monahan TS, Sawmiller DR, Fenton RA, Dobson JG Jr (2000) Adenosine A(2a)-receptor activation increases contractility in isolated perfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1472-H1481
- Münch G, Bölck B, Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RHG (1998) Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. *J Mol Med* 76: 434-441
- Mumby MC, Russell KL, Garrard LJ, Green DD (1987) Cardiac contractile protein phosphatases. Purification of two enzyme forms and their characterization with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* 262: 6257-6265
- Murata K, Wu J, Brautigan DL (1997) B cell receptor-associated protein $\alpha 4$ displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10624-10629
- Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE (1990) Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr 1* gene expression. *Biochemistry* 29: 10351
- Nairn AC, Palfrey HC (1987) Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem* 262: 17299-17303
- Nairn AC, Shenolikar S (1992) The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 2: 296-301
- Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31: 317-334
- Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart. Evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265: H257-H266
- Neumann J, Boknik P, DePaoli-Roach AA, Field LJ, Rockman HA, Kobayashi YM, Kelley JS, Jones LR (1998) Targeted overexpression of phospholamban to mouse atrium depresses Ca²⁺ transport and contractility. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1991-2002

- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-272
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457
- Neumann J, Maas R, Boknik P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H (1999) Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 188-193
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Stein B (1989) Effects of adenosine analogues on contractile response and cAMP content in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 689-695
- Ninomiya H, Otani H, Lu K, Uchiyama T, Kido M, Imamura H (2002) Complementary role of extracellular ATP and adenosine in ischemic preconditioning in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1810-H1820
- Nishimaru K, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K (2000) Positive and negative inotropic effects of muscarinic receptor stimulation in mouse left atria. *Life Sci* 66: 607-615
- O'Brian JJ, Ram ML, Kiarash A, Cala SE (2002) Mass spectrometry of cardiac calsequestrin characterizes microheterogeneity unique to heart and indicative of complex intracellular transit. *J Biol Chem* 277: 37154-37160
- Oike M, Kimura C, Koyama T, Yoshikawa M, Ito Y (2000) Hypotonic stress-induced dual Ca^{2+} responses in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H630-H638
- Olsson RA, Pearson JD (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerriero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG (2005) Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 96: 756-766
- Penny WF, Hammond HK (2017) Randomized Clinical Trials of Gene Transfer for Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Hum Gene Ther* 28: 378-384
- Podrasky E, Xu D, Liang BT (1997) A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H2380-H2387
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MMAM, Wilde AAM, Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91: e21-e26

- Praetorius HA, Leipziger J (2009) ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal* 5: 433-446
- Puceat M, Clement-Chomienne O, Terzic A, Vassort G (1993) Alpha 1-adrenoceptor and purinoceptor agonists modulate Na-H antiport in single cardiac cells. *Am J Physiol* 264: H310-H319
- Qvigstad E, Brattelid T, Sjaastad I, Andressen KW, Krobert KA, Birkeland JA, Sejersted OM, Kaumann AJ, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO (2005a) Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res* 65: 869-878
- Qvigstad E, Sjaastad I, Brattelid T, Nunn C, Swift F, Birkeland JA, Krobert KA, Andersen GØ, Sejersted OM, Osnes JB, Levy FO, Skomedal T (2005b) Dual serotonergic regulation of ventricular contractile force through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors induced in the acute failing heart. *Circ Res* 97: 268-276
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492
- Ramkumar V, Pierson G, Stiles GL (1988) Adenosine receptors: clinical implications and biochemical mechanisms. *Prog Drug Res* 32: 195-247
- Redpath NT, Proud CG (1990) Activity of protein phosphatases against initiation factor-2 and elongation factor-2. *Biochem J* 272: 175-180
- Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A₁-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol* 5: 1037-1048
- Roach P, Roach PJ, DePaoli-Roach AA (1985) Phosphoprotein phosphatase inhibitor-2. Identification as a species of molecular weight 31,000 in rabbit muscle, liver, and other tissues. *J Biol Chem* 260: 6314-6317
- Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM, Feldman JM (1995) Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 92: 790-795
- Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG (2007) Phosphorylation of Human Inhibitor-1 at Ser-67 and/or Thr-75 Attenuates the Stimulatory Effects of Protein Kinase A-Signaling in Cardiac Myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H762-H769
- Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR, Kranias EG (2006) Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem* 281: 38599-38608
- Ryazanov AG, Shestakova EA, Natapov PG (1988) Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* 334: 170-173

- Saito D, Ueeda M, Abe Y, Tani H, Nakatsu T, Yoshida H, Haraoka S, Nagashima H (1986) Treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia with intravenous injection of adenosine triphosphate. *Br Heart J* 55: 291-294
- Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG (1993) Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10365-10369
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5683-5686
- Scamps F, Legssyer A, Mayoux E, Vassort G (1990) The mechanism of positive inotropy induced by adenosine triphosphate in rat heart. *Circ Res* 67: 1007-1016
- Schwinger RH, Münch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca⁽²⁺⁾-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31: 479-491
- Shen J-B, Pappano AJ, Liang BT (2006) Extracellular ATP-stimulated current in wild-type and P2X₄ receptor transgenic mouse ventricular myocytes: implications for a cardiac physiologic role of P2X₄ receptors. *FASEB J* 20: 277-284
- Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23: 1-121
- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139: 468-484
- Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 79: 2-10
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947
- St-Denis N, Gupta GD, Lin ZY, Gonzalez-Badillo B, Veri AO, Knight JDR, Rajendran D, Couzens AL, Currie KW, Tkach JM, Cheung SWT, Pelletier L, Gingras AC (2016) Phenotypic and Interaction Profiling of the Human Phosphatases Identifies Diverse Mitotic Regulators. *Cell Rep* 17: 2488-2501
- Stein B, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Scholz H (1993) Pertussis toxin unmasks stimulatory A₂-adenosine receptors on ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 25: 655-659
- Sugita M, Yue Y, Foskett JK (1998) CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 17: 898-908
- Sulakhe PV, Vo XT (1995) Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* 149-150:103-126

- Tatur S, Groulx N, Orlov SN, Grygorczyk R (2007) Ca^{2+} -dependent ATP release from A549 cells involves synergistic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *J Physiol* 584: 419-435
- Terentyev D, Cala SE, Houle TD, Viatchenko-Karpinski S, Gyorke I, Terentyeva R, Williams SC, Györke S (2005) Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ Res* 96: 651-658
- Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Györke I, Volpe P, Williams SC, Györke S (2003) Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11759–11764
- Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia HH, Escobar AL, Györke S (2002) Luminal Ca^{2+} controls termination and refractory behavior of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Circ Res* 91: 414-420
- Tramontana M, Giuliani S, Del Bianco E, Lecci A, Maggi CA, Evangelista S, Geppetti P (1993) Effects of capsaicin and 5-HT₃ antagonists on 5-hydroxytryptamine-evoked release of calcitonin gene-related peptide in the guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 108: 431-435
- Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140: 1–22
- Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lübbert H (1995) Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters* 370: 215-221
- Uozumi H, Kudoh S, Zou Y, Harada K, Yamazaki T, Komuro I (1998) Autocrine release of ATP mediates mechanical stress-induced cardiomyocytes hypertrophy. *Circulation* 98: I 624
- Vahlensieck U, Boknik P, Gombosova I, Huke S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Neumann J, Deng MC, Scheld HH, Jankowski H, Schlüter H, Zidek W, Zimmermann N, Schmitz W (1999) Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate (AP4A) in human and animal cardiac preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 805-813
- Vassort G (2001) Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev* 81: 767-806
- Verbeuren TJ (1990) The distribution and biochemistry of 5-HT in the cardiovascular system. In: Saxena PR, Wallis DI, Wouters W, Bevan P (eds) *Cardiovascular Pharmacology of 5-Hydroxytryptamine*. Kluwer, Dordrecht, pp 3-13
- Verbeuren TJ (1992) Distribution, synthesis, metabolism, release, uptake, and passage across body membranes in cardiovascular tissues including blood-brain barrier. In: Olesen J, Saxena PR (eds) *5-Hydroxytryptamine*. Raven Press, New York
- Virshup DM (2000) Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* 12: 180-185
- von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-432

- Wallukat G (2002) The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27: 683-690
- Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV, Downey JM (1998) Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 98: 899-905
- Welford LA, Cusack NJ, Hourani SM (1987) The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P₂-purinoceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency. *Eur J Pharmacol* 141: 123-130
- Wihlborg AK, Balogh J, Wang L, Borna C, Dou Y, Joshi BV, Lazarowski E, Jacobson KA, Arner A, Erlinge D (2006) Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P₂Y₂ and P₂Y₆ receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res* 98: 970-976
- Xu H, Stein B, Liang B (1996) Characterization of a stimulatory adenosine A_{2a} receptor in adult rat ventricular myocyte. *Am J Physiol* 270: H1655-H1661
- Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, McGonigle P, Levy RJ, Liang B (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 161: 2209-2218
- Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, Wang L, Aoki H, Matsuzaki M (2006) Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* 20: 1197-1199
- Yang A, Sonin D, Jones L, Barry WH, Liang BT (2004) A beneficial role of cardiac P₂X₄ receptors in heart failure: rescue of the calsequestrin overexpression model of cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1096-H1103
- Yuan Q, Fan GC, Dong M, Altschafel B, Diwan A, Ren X, Hahn HH, Zhao W, Waggoner JR, Jones LR, Jones WK, Bers DM, Dorn II GW, Wang HS, Valdivia HH, Chu G, Kranias EG (2007) Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* 115: 300-309
- Yusuf S, Al-Saady N, Camm AJ (2003) 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol* 14: 209-214
- Zhang L, Franzini-Armstrong C, Ramesh V, Jones LR (2001) Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* 33: 233-247
- Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272: 23389-23397
- Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH (2002) The cardiac-specific nuclear delta(B)

isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 277: 1261-1267

Zimmermann N, Nacke P, Neumann J, Winter J, Gams E (2000) Inotropic effects of diadenosine monophosphate (AP1A) in isolated human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 881-886

9. THESEN

1. Die positiv inotropen und lusitropen Effekte von Serotonin (5-HT) in rechten Vorhöfen des Menschen sind über 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt.
2. Die 5-HT-Effekte sind begleitet von bzw. eine Folge des erhöhten cAMP-Gehalts und der darauffolgenden Phosphorylierung von Ca²⁺-regulatorischen Proteinen. Diese Effekte kann man an einem transgenen Mausmodell nachvollziehen und in vivo testen.
3. ATP hat einen biphasischen Effekt auf die Kontraktionskraft des menschlichen Vorhofs. Möglicherweise spielt mithin ATP eine physiologische Rolle im menschlichen Herzen: zum Beispiel um nach einer Schädigung des Arbeitsmyokards die Kontraktilität zum Teil aufrecht zu erhalten.
4. Versuche mit subtypspezifischen Purinozeptor-Agonisten und -Antagonisten deuteten eventuell auf die Beteiligung eines P_{2X4}-Rezeptors am positiv inotropen Effekt von ATP hin.
5. Die Wirkung von Adenosin im menschlichen Vorhof ist von klinischer Relevanz, z.B. um supraventrikuläre Arrhythmien zu behandeln, da Adenosin über A₁-Adenosinrezeptoren negativ inotrope Effekte am menschlichen Vorhof ausüben kann. Aber Adenosin kann zumindest bei einigen Patienten auch zu einem bisher nicht bemerkten positiv inotropen Effekt führen.
6. Die reversible Proteinphosphorylierung ist ein essentieller Mechanismus für zahlreiche zelluläre Funktionen. Störungen in der Proteinphosphataseexpression könnten mithin zu Herzerkrankungen führen bzw. könnten diese verstärken.
7. Die Befunde an PP2A-transgenen Mäusen deuten auf eine wichtige Rolle der PP2A für die Funktion des Herzens hin. So entwickelten die PP2A-transgenen Mäuse eine Herzhypertrophie, eine ventrikuläre Dilatation und eine verminderte kardiale Kontraktilität, die Ähnlichkeiten zu einigen menschlichen Formen der Herzinsuffizienz aufwies.
8. Entsprechendes gilt insbesondere auch für die PP1. Hier konnten durch Koexpression des PP1-Inhibitors I-2 die negativen Auswirkungen der PP1 verhindert werden. Somit könnten PP1-Hemmstoffe wie z.B. I-2 neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung der Symptome einer Herzinsuffizienz darstellen.
9. Neben den posttranslationalen Modifikationen ist auch die Expression von Ca²⁺-regulatorischen Proteinen von Bedeutung. So hatte die erhöhte Expression von Junctin negative funktionelle Auswirkungen, was dessen Herabregulation bei der menschlichen Herzinsuffizienz als einen kompensatorischen Mechanismus erscheinen läßt.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials 'U.G.' followed by a flourish.

Halle (Saale), den 25.07.2018

Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Habilitationsversuche gab, weder mit dieser Arbeit noch mit einer anderen, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters that appear to be 'U.G.' followed by a flourish.

Halle (Saale), den 25.07.2018

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Gergs, Dr. rer. nat.
Vornamen: Ulrich Kurt
Geburtsdatum/-ort: 26.06.1966, Herten

Hochschulbildung und beruflicher Werdegang:

1985 Allgemeine Hochschulreife in Recklinghausen

1986 – 1992 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
Abschluß: Diplom-Biologe
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter Leitung von Prof. Dr. E.W. Weiler
Thema: *Untersuchungen zum Vorkommen und zur zellfreien Synthese von Phaseinsäure*

1993 – 1997 Dissertation am Institut für Genetik, Abteilung Molekulargenetik, der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. K. Willecke) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. O. Traub
Thema: *Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung von Proteinkinasen, die das Gap-Junction-Protein Connexin43 phosphorylieren*

1997 – 1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Fakultät Mannheim (Medizinische Klinik II, Direktor: Prof. Dr. G. Ertl, Arbeitsgruppe: Dr. W. Schorb) der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

1999 – 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. W. Schmitz, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. J. Neumann) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Universitätsklinikum

ab 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. J. Neumann), Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zusatzqualifikationen:

WS 2000/2001 Fortbildung: Kursus der Versuchstierkunde

SS 2001	Fortbildung: Sicherheitsmaßnahmen und Arbeitsschutz bei gentechnischen Arbeiten
WS 2001/2002	Fortbildung: PoL-Tutoretraining der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
SS 2004	Fortbildung zur Gefahrgutbeauftragtenverordnung
WS 2008/2009	Fortbildung: Workshop „Kleingruppen-Didaktik“ der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
WS 2009/2010	Fortbildung: Kursus zum Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz im Forschungszentrum Dresden Rossendorf, Forschungsstelle Leipzig
SS 2010	Fortbildung: Seminar „Medienpass – Vermittlung von Grundlagen in Bild-, Audio- und Videobearbeitung“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
WS 2010/2011	Fortbildung: Seminar „Basiswissen Hochschuldidaktik I“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
SS 2011	Fortbildung: Seminar „Basiswissen Hochschuldidaktik II“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
SS 2012	Fortbildung: Hochschullehrertraining in Wittenberg (Leucorea) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
SS 2015	Fortbildung: Aktualisierung der Fachkunde im Strahlenschutz im Helmholtz Zentrum Dresden Rossendorf, Forschungsstelle Leipzig
WS 2015/2016	Fortbildung: M3-Prüferworkshop der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
WS 2017/2018	Fortbildung: Teilnahme am versuchstierkundlichen Kolloquium vom 14.12.2017
WS 2017/2018	Fortbildung: Teilnahme am versuchstierkundlichen Kolloquium vom 15.02.2018

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. med. Joachim Neumann, der mich in den vielen gemeinsamen Jahren in jeder Hinsicht unterstützte, mir hervorragende Forschungsmöglichkeiten gab und immer Zeit für wertvolle Anregungen und Diskussionen fand.

Meinen Kollegen PD Dr. Peter Boknik und Prof. Dr. med. Uwe Kirchhefer danke ich für die freundschaftliche und hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Besonders danken möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie – ganz besonders Pia Willmy, Sonja Reber und Stephanie Simmrodt – für die vielen hervorragenden Versuche, ihre jederzeit gewährte freundliche Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und Hilfe sowie die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein Dankeschön auch an alle Doktorandinnen und Doktoranden, deren großartiger Einsatz in den zurückliegenden Jahren viele Untersuchungen, Veröffentlichungen und Vorträge erst möglich gemacht hat.

Ein großes Dankeschön an meine Familie, ohne deren Rückhalt und Unterstützung vieles von dem, was ich erreicht habe, nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danke ich meiner Frau Sabine für ihre moralische Unterstützung, ihr großes Verständnis und die Liebe, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.