

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:	Kerckhoff-Klinik GmbH Bad Nauheim
Projektleiter:	PD Dr. rer. nat. Muhammad Aslam
Projekttitel:	Estrogen-dependent activation of the sAC-AMPK pathway as a new strategy to protect coronary endothelial cell function
Projekttyp:	Säule B18-016_SE
Förderkennzeichen:	81X2200203
Laufzeit des Projektes:	01.06.2018 - 31.05.2019

I. Kurze Darstellung zu

1. *Aufgabenstellung,*

Das Hauptziel des geplanten Vorhabens in Bad Nauheim war die Charakterisierung des sAC/cAMP-AMPK Signalwegs in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion, seine Bedeutung für die mitochondriale Funktion und dessen Modulation durch die Aktivierung der Östrogenrezeptoren. Die Untersuchungen erfolgten mittels endothelialer Monoschichtpermeabilität, Westernblot-, „live-cell imaging“- und FRET-basierten Analysen in humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) und Koronarendothelzellen aus Ratten.

2. *Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,*

Das Projekt wurde im Rahmen der Säule B („Präklinische Forschung“) des DZHKs durchgeführt, bei der die Finanzierung durch die flexiblen Mittel des DZHKs bei Beteiligung von mindestens zwei DZHK-Partnerstandorten bzw. einem DZHK-Partnerstandort mit einem nicht-DZHK-Partner erfolgt. Die entsprechenden Vorgaben wurden beachtet und das Projekt in Kooperation mit der *Charité-Universitätsmedizin Berlin* bearbeitet.

3. *Planung und Ablauf des Vorhabens,*

Die Versuche wurden im Juni 2018 gestartet und im Mai 2019 beendet.

Das Hauptziel des Vorhabens beinhaltete eine Analyse des Östrogen-sAC-AMPK Signalwegs in Bezug auf die mitochondriale Biologie und die endotheliale Barrierefunktion.

In dem hier beschriebenen Projekt wurden die folgenden Analysen / Versuche in Endothelzellen durchgeführt:

- Analyse der endothelialen Barrierefunktion
- qPCR- und Westernblot-Analysen der AMPK-Expression und Aktivierung in Endothelzellen

- Untersuchung der mitochondrialen Biogenese und Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials in Endothelzellen
- Analyse der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Produktion
- Analyse des zellulären Ca^{2+} -Spiegels in Endothelzellen
- Analyse des zellulären cAMP
- Analyse der Transmigration von Monozyten

Es gab keine Änderungen in der Planung und im Ablauf des Vorhabens.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden, Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste.

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle in der Endothelfunktion. Die jüngsten Studien zeigen, dass der mitochondriale cAMP-Signalweg eine Schlüsselrolle für die mitochondriale Dynamik, Biogenese und Funktion spielt.

Obwohl die Rolle des cAMP-Signals bei der Modulation der AMPK-Aktivität eindeutig gezeigt wurde, ist die Quelle des cAMP und der cAMP-Kompartimente, die die AMPK-Aktivität steuern (Plasmamembran, nukleär oder zytoplasmisch) unbekannt. Zwei Klassen von Adenylylcyclasen können zur cAMP-Synthese in der Zelle beitragen: Transmembran-Adenylylcyclasen (tmAC) und lösliche Adenylylcyclasen (sAC). sAC ist ein einzigartiger intrazellulärer Ca^{2+} - und Bikarbonat-Sensor mit enzymatischer Aktivität [Chen et al. 2000]. Unsere jüngsten Studien haben gezeigt, dass sAC eine Schlüsselrolle bei der Apoptose von Endothelzellen [Kumar et al. 2009], Kardiomyozyten [Appukuttan et al., 2012] und glatten Muskelzellen [Appukuttan et al., 2013; Kumar et al., 2014] sowie bei der Epithelzellproliferation [Flacke et al., 2013] spielt.

Im Gegensatz zu tmAC ist sAC im Cytosol, Zellkern und Mitochondrien lokalisiert [Kumar et al., 2009], d. h. in unmittelbarer Nähe der AMPK und ihrer stromabwärts gelegenen Ziele. Es gibt Hinweise darauf, dass tmAC aktivierende Stimuli wie Forskolin oder Isoproterenol die AMPK-Aktivität beeinflussen [Djouder et al., 2010; Hurley et al., 2006]. Im Gegensatz dazu ist die Rolle von sAC noch unbekannt. Unsere vorläufigen Daten lassen vermuten, dass sAC an der basalen Kontrolle der AMPK-Aktivität in Herzzellen beteiligt ist. Darüber hinaus führt die Stimulierung von sAC mit Bikarbonat zur PKA-abhängigen Phosphorylierung (Thr-172) und zur Aktivierung von AMPK.

Die Rolle der ER-Signalisierung bei der cAMP-abhängigen Modulation der AMPK-Aktivität bleibt unbekannt. Es wurde gezeigt, dass Estradiol die cAMP / PKA-Signalgebung in verschiedenen Zelltypen positiv reguliert, z. B. Ratten-Kardiomyozyten [Buitrago et al., 2000], glatten Muskelzellen der Koronararterie [Yu et al., 2014] oder HUVEC [Kong et al., 2014]. Ob diese Aktivierung der cAMP-Signalisierung sAC-abhängig ist und in AMPK übersetzt wird, ist noch nicht bekannt und sollte in unserem Vorhaben untersucht werden.

Zitierte Literatur:

1. Chen, Y.; Cann, M.J.; Litvin, T.N.; Iourgenko, V.; Sinclair, M.L.; Levin, L.R.; Buck, J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **2000**, *289*, 625-8.
2. Kumar, S.; Kostin, S.; Flacke, J.P.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 14760-8.

3. Appukuttan, A.; Kasseckert, S.A.; Micoogullari, M.; Flacke, J.P.; Kumar, S.; Woste, A.; Abdallah, Y.; Pott, L.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* **2012**, *93*, 340-9.
4. Appukuttan, A.; Flacke, J.P.; Flacke, H.; Posadowsky, A.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Inhibition of soluble adenylyl cyclase increases the radiosensitivity of prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1842*, 2656-63.
5. Appukuttan, A.; Kasseckert, S.A.; Kumar, S.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Oxysterol-induced apoptosis of smooth muscle cells is under the control of a soluble adenylyl cyclase. *Cardiovasc Res* **2013**, *99*, 734-42.
6. Kumar, S.; Appukuttan, A.; Maghnouj, A.; Hahn, S.; Peter Reusch, H.; Ladilov, Y. Suppression of soluble adenylyl cyclase protects smooth muscle cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis* **2014**, *19*, 1069-79.
7. Flacke, J.P.; Flacke, H.; Appukuttan, A.; Palisaar, R.J.; Noldus, J.; Robinson, B.D.; Reusch, H.P.; Zippin, J.H.; Ladilov, Y. Type 10 soluble adenylyl cyclase is overexpressed in prostate carcinoma and controls proliferation of prostate cancer cells. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 3126-35.
8. Djouder, N.; Tuerk, R.D.; Suter, M.; Salvioni, P.; Thali, R.F.; Scholz, R.; Vaahtomeri, K.; Auchli, Y.; Rechsteiner, H.; Brunisholz, R.A.; Viollet, B.; Makela, T.P.; Wallimann, T.; Neumann, D.; Krek, W. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. *EMBO J* **2010**, *29*, 469-81.
9. Hurley, R.L.; Barre, L.K.; Wood, S.D.; Anderson, K.A.; Kemp, B.E.; Means, A.R.; Witters, L.A. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 36662-72.
10. Buitrago, C.; Massheimer, V.; de Boland, A.R. Acute modulation of Ca²⁺ influx on rat heart by 17 β -estradiol. *Cell Signal* **2000**, *12*, 47-52.
11. Yu, T.; Liu, M.; Luo, H.; Wu, C.; Tang, X.; Tang, S.; Hu, P.; Yan, Y.; Wang, Z.; Tu, G. GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 β -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2014**, *143*, 392-403.
12. Kong, B.S.; Cho, Y.H.; Lee, E.J. G protein-coupled estrogen receptor-1 is involved in the protective effect of protocatechuic aldehyde against endothelial dysfunction. *PLoS One* **2014**, *9*, e113242.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es wurde eine Kooperation mit PD Dr. Wolfgang Meissner (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) im Gebiet der „Cell Metabolism“ eingegangen.

II. Eingehende Darstellung zu

1. *der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen,*

Das erste Ziel des geplanten Vorhabens war, den sAC/cAMP-AMPK-Signalweg im Rahmen der endothelialen Barrierefunktion zu charakterisieren. Dazu wurden endotheliale Monoschichtpermeabilität, Westernblot-, „live-cell imaging“- und FRET-basierte Analysen in HUVEC und Koronarendothelzellen aus Ratten durchgeführt.

Die Aktivierung von sAC mit Bikarbonat führte zu erhöhten zellulären cAMP-Spiegeln und einer Hemmung der TNF α induzierten endothelialen Hyperpermeabilität. Im Gegensatz dazu führte die pharmakologische Hemmung von sAC mit KH7 führt zu einer über die TNF α induzierten Verstärkung der endothelialen Hyperpermeabilität. Die Aktivierung von sAC wurde durch eine erhöhte Phosphorylierung von AMPK begleitet und die pharmakologische Aktivierung von AMPK mit A769662 hatte eine ähnliche Wirkung auf die Endothel-Barrierefunktion. In ähnlicher Weise führte in Endothelzellen die mitochondriale cAMP-Erhöhung durch eine Hemmung von PDE2 (Phosphodiesterase 2) mit der selektive Inhibitor Bay 60-7550 zu AMPK-Aktivierung. Darüber hinaus führte Bay 60-7550 zu einer Hemmung der TNF α induzierten endothelialen Hyperpermeabilität.

Zusammenfassend bestätigen die Daten die Existenz des sAC-AMPK-Signalwegs in Endothelzellen und geben einen Hinweis auf eine selektive Unterdrückung der PDE2 als mögliches therapeutisches Ziel, um den sAC-AMPK-Signalweg zu stimulieren.

Weiterhin wurde untersucht, ob die zytosolische cAMP-Erhöhung zur mitochondrialen Funktionsverbesserung führt. Dazu wurde zuerst die FRET-basierte, „real time“ ATP Messung Analyse der ROS-produktion und Ca^{2+} -Spiegel in HUVEC etabliert. Die Analysen zeigen, dass der PDE2-Hemmstoff Bay 60-7550 zur Verbesserung der maximalen mitochondrialen ATP-Synthese führt. Darüber hinaus reduzierte Bay 60-7550 die mitochondriale ROS(H_2O_2)-Produktion und antagonisierte die $\text{TNF}\alpha$ induzierte Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials. Darüber hinaus verringerte es die ATP-Verbrauchsrate der Zellen. Es hatte jedoch keinen Einfluss auf die zellulären Ca^{2+} -Spiegel. Zusammen mit erhöhter AMPK-Aktivität weisen die Daten auf eine mögliche AMPK-gesteuerte mitochondriale Biogenese hin.

Das zweite Ziel war die Klärung der Frage, ob Östrogen den sAC-AMPK Signalweg in Endothelzellen beeinflussen kann. Die Aktivierung der endothelialen Östrogenrezeptoren wurde mit β -Estradiol (E2) oder mit Hilfe Isoform-spezifischer Östrogenrezeptoragonisten erreicht. Koronarendothelzellen wurden für verschiedene Zeiträume (10h und 24h) mit E2 oder Agonisten behandelt, und unterschiedliche funktionelle Assays wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von inflammatorischen Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml; 12 h) und Thrombin (0,3 IE/ml) durchgeführt. Die Aktivierung von Östrogenrezeptoren durch Östradiol- und Östrogenrezeptoragonisten wurde durch ERK-Phosphorylierung bestätigt. Die Westernblot-Analysen zeigten, dass eine Estradiol-Behandlung (10 nmol/l, 24 Stunden) weder die sAC- noch die pAMPK-Expression in Koronarendothelzellen verändert. Ebenso verändert Östrogen in HUVEC die AMPK-phosphorylierung nicht signifikant.

Obwohl die Behandlung mit Estradiol die durch Thrombin induzierte endotheliale Hyperpermeabilität abschwächen könnte, hatte sie weder eine Auswirkung auf die durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte Hyperpermeabilität noch auf die Hochregulierung von Entzündungsgenen (z. B. IL-1, IL-6, IL-8, VCAM-1 und ICAM-1). Ebenso wurde keine Wirkung von Estradiol (oder spezifischen Rezeptor Agonisten) auf das mitochondriale Membranpotenzial, ROS-Produktion oder die mitochondriale Biogenese beobachtet. Da der selektive PDE2-Inhibitor Bay 60-7550 den mitochondrialen cAMP-Spiegel erhöhen konnte, wurde er als alternativer therapeutischer Ansatz zur sAC/cAMP-AMPK-Signalweg Aktivierung untersucht. Die Untersuchung der transendothelialen Migration von Monozyten zeigte, dass der selektive PDE2-Inhibitor Bay 60-7550, jedoch nicht Östradiol, die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Transmigration von Monozyten abschwächte.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Förderung umfasste Sachmittel und Reisekosten laut Belegliste. Die Mittel wurden für die Experimente fast vollständig verausgabt. Ein Teil der Reisekosten wurde nicht verbraucht.

Die Mittel wurden wie geplant eingesetzt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Im Rahmen der präklinischen Forschung werden ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners (d.h. beteiligte Shared Expertise) zur Verfügung gestellt. In diesem Projekt wurde eine wichtige Grundlage für das Verständnis des sAC/cAMP-AMPK Signalwegs in der endothelialen Barrierefunktion und die Bedeutung für die mitochondriale Funktion in Endothelzellen geschaffen.

4. dem voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans mit Zeithorizont,

Die erzielten Ergebnisse sind die Grundlage für weitere Projekte auf dem Gebiet der Endothelforschung.

5. dem während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Es sind von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt geworden, die wesentlichen Einfluss auf die Verwertung der Ergebnisse nehmen.

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Ein Abstrakt für den DGK Jahreskongress 2020 wurde eingereicht.

Ein Manuskript zur Veröffentlichung ist in Vorbereitung. Die Projektergebnisse sollen bis Mitte 2020 in einem peer-review Fachjournal eingereicht/veröffentlicht werden.

Bad Nauheim, den 10.12.2019

PD Dr. Muhammad Aslam

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Estrogen-dependent activation of the sAC-AMPK pathway as a new strategy to protect coronary endothelial cell function	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] PD Dr. Aslam, Muhammad	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.05.2019
	6. Veröffentlichungsdatum -
	7. Form der Publikation -
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Kerckhoff-Klinik GmbH Abt. Kardiologie Benekestrasse 2-8 61231 Bad Nauheim	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen 81X2200203
	11. Seitenzahl Anzahl (aus Schlussbericht)
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung Kapelle-Ufer 1, 10117 Berlin Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst; Rheinstraße 23-25, 65185 Wiesbaden	13. Literaturangaben 12
	14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 0
16. Zusätzliche Angaben --	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Fördermittelmanagement des DZHK am MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT, Berlin	
18. Kurzfassung Das Ziel des geplanten Vorhabens war den sAC/cAMP-AMPK-Signalweg im Rahmen der endothelialen Barrierefunktion zu charakterisieren und ob Östrogen den sAC-AMPK Signalweg in Endothelzellen beeinflussen kann. Die Aktivierung von sAC mit Bikarbonat führte zu erhöhten zellulären cAMP-Spiegeln und einer Hemmung der TNF α induzierten endothelialen Hyperpermeabilität. Im Gegensatz dazu führte die pharmakologische Hemmung von sAC mit KH7 zu einer über die TNF α induzierten Verstärkung der endotheliale Hyperpermeabilität. Die Aktivierung von sAC wurde durch eine erhöhte Phosphorylierung von AMPK begleitet und die pharmakologische Aktivierung von AMPK mit A769662 hatte eine ähnliche Wirkung auf die Endotheliale-Barrierefunktion. Ähnlich, führte in Endothelzellen die mitochondriale cAMP-Erhöhung durch eine Hemmung von PDE2 mit Bay 60-7550 zu AMPK-Aktivierung. Darüber hinaus führte Bay 60-7550 zu einer Hemmung der TNF α induzierten endothelialen Hyperpermeabilität. Es wurde weiter untersucht ob die zytosolische cAMP-Erhöhung zur mitochondrialen Funktionsverbesserung führt. Die Analysen zeigen, dass der PDE2-Hemmstoff Bay 60-7550 zur Verbesserung der maximalen mitochondrialen ATP-Synthese führt. Darüber hinaus reduzierte Bay 60-7550 die Mitochondrialen ROS(H ₂ O ₂)-Produktion und antagonisierte die TNF α induzierte Reduktion des mitochondrialen Membranpotenzials. Es hat jedoch keinen Einfluss auf die zellulären Ca ²⁺ -Spiegel. Die Westernblot-Analysen zeigen, dass eine Estradiol-Behandlung (10 nmol/l, 24 Stunden) weder die sAC- noch die pAMPK-Expression in Koronarendothelzellen verändert. Ähnlich in HUVEC verändert Östrogen die pAMPK-Expression nicht signifikant. Obwohl die Behandlung mit Estradiol die durch Thrombin induzierte endotheliale Hyperpermeabilität abschwächen könnte, hatte sie weder eine Auswirkung auf die durch TNF α induzierte Hyperpermeabilität noch auf die Hochregulierung von Entzündungsgenen (z. B. IL-1, IL-6, IL-8, VCAM-1 und ICAM-1). Ebenso wurde keine Wirkung von Estradiol (oder spezifischen Rezeptor Agonisten) auf das mitochondriale Membranpotential, ROS-Produktion oder die mitochondriale Biogenese beobachtet. Zusammenfassend bestätigen die Daten die Existenz des sAC-AMPK-Signalwegs in Endothelzellen und weisen auf eine selektive Unterdrückung der PDE2 als mögliches therapeutisches Ziel um den Signalweg zu stimulieren.	
19. Schlagwörter PDE2, AMPK, mitochondriale Biogenese, endotheliale Barrierefunktion	
20. Verlag	21. Preis

Bad Nauheim, den 10.12.2019.....

PD Dr. Muhammad Aslam