

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Die Bedeutung putativer CaMKII-Phosphorylierungsstellen von PP1-Inhibitor-1 für den
Phosphorylierungsstatus exemplarischer PP1-Targets*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rainer Weiß

2023

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Die Bedeutung putativer CaMKII-Phosphorylierungsstellen von PP1-Inhibitor-1 für den
Phosphorylierungsstatus exemplarischer PP1-Targets*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rainer Weiß

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Stefan Neef

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Hirt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2024

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. ELEKTROMECHANISCHE KOPPLUNG	2
1.2. ANPASSUNG AN BELASTUNG VIA BETA-ADRENERGE REAKTION: DER PKA-SIGNALWEG	4
1.3. DER CAMKII-SIGNALWEG	5
1.4. PROTEINPHOSPHATASEN ALS GEGENSPIELER DER KINASEN	7
1.5. PROTEINPHOSPHATASE-1-INHIBITOR-1	9
1.6. VERKNÜPFUNG ZWISCHEN PKA- UND CAMKII-SIGNALWEG	13
1.7. FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. ISOLATION, KULTIVIERUNG UND TRANSFEKTION MURINER KARDIOMYOZYTEN	17
2.1.1. <i>Vorbereitungen Zellkultur</i>	17
2.1.2. <i>Generierung der Viren</i>	17
2.1.3. <i>Isolation adulter muriner Kardiomyozyten</i>	18
2.1.4. <i>Kultur adulter muriner Kardiomyozyten</i>	20
2.1.5. <i>Ermittlung der Zellzahl</i>	22
2.1.6. <i>Virustransfektion</i>	23
2.1.7. <i>Lyse der Zellen</i>	24
2.1.8. <i>Optimierung der Zellkulturbedingungen</i>	25
2.2. PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	26
2.2.1. <i>Bestimmung der Proteinmenge mittels BCA-Test</i>	26
2.2.2. <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	26
2.2.3. <i>Western-Blot</i>	28
2.2.4. <i>Statistische Auswertung</i>	31
2.3. PHOSPHATASE-AKTIVITÄTS-ASSAY	32
2.3.1. <i>Vorbereitung der Proben</i>	32
2.3.2. <i>Vorbereitung Phosphatase-Hemmstoffe</i>	32
2.3.3. <i>Durchführung Phosphatase-Aktivitäts-Assay</i>	34

3. ERGEBNISSE	36
3.1. OPTIMIERUNG DER ISOLATION, KULTIVIERUNG UND PROTEINNUTZUNG	36
3.1.1. <i>Optimierung der Isolationsbedingungen</i>	36
3.1.2. <i>Optimierung der Kulturbedingungen</i>	36
3.1.3. <i>Optimierung der Proteininnutzung</i>	40
3.2. EVALUATION DER VIRUSMENGEN FÜR DIE TRANSFIZIERUNG	42
3.2.1. <i>Einstellung der Virusmenge für Wildtyp-I-1</i>	42
3.2.2. <i>Einstellung der Virusmenge für die I-1-Mutanten</i>	44
3.3. EINFLUSS DER PHOSPHOMIMETISCHEN I-1 MUTATIONEN AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG VON PP1-ZIELPROTEINEN (WESTERN-BLOT)	46
3.3.1. <i>Einfluss der T42D-Mutation von Inhibitor-1</i>	46
3.3.2. <i>Einfluss der S46D-Mutation von Inhibitor-1</i>	52
3.3.3. <i>Einfluss der S47D-Mutation von Inhibitor-1</i>	58
3.3.4. <i>Einfluss der T136D-Mutation von Inhibitor-1</i>	64
3.4. ERGEBNISSE DER PHOSPHATASE-AKTIVITÄTS-ASSAYS	70
4. DISKUSSION	73
5. ZUSAMMENFASSUNG	81
6. ANHANG	82
6.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	82
6.2. LISTE DER VERWENDETOEN ANTIKÖRPER	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	85
8. DANKSAGUNG	97

1. Einleitung

Das Herz ist eines der zentralen Organe des menschlichen Körpers. Im Laufe eines Lebens führt es oft mehr als 2 Milliarden Kontraktionen aus und stellt mit jedem Einzelnen dieser Schläge überlebenswichtige Transportfunktionen sicher. Störungen dieser stetig wiederkehrenden Abläufe stellen eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität in unserer Gesellschaft dar. So war im Jahr 2019 bei 35 % der Todesfälle in Deutschland eine kardiovaskuläre Erkrankung todesursächlich. (1) Im selben Jahr wurden in deutschen Krankenhäusern 2,9 Millionen Patientenfälle auf Grund von kardiovaskulären Erkrankungen stationär behandelt, dies entspricht 14 % aller stationären Behandlungen. (2) Eine Vielzahl dieser Erkrankungen lässt sich durch Optimierung der kardiovaskulären Risikofaktoren vermeiden, so berechnete eine aktuelle Studie von Yusuf et al., dass sich ca. 70 % der durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Todesfälle auf modifizierbare Risikofaktoren zurückführen lassen. (3) Einen wesentlichen Aspekt zur Senkung der oben genannten Morbidität und Mortalität stellt also die optimale Einstellung aller kardiovaskulären Risikofaktoren dar.

Im ärztlichen Alltag müssen jedoch oft Patienten behandelt werden, bei denen sich bereits eine oder mehrere kardiovaskuläre Erkrankungen manifestiert haben. Zusätzlich zur weiterhin notwendigen Optimierung der Risikofaktoren besteht dann die Notwendigkeit zur gezielten Behandlung der jeweiligen Erkrankungen. So stehen für die meisten kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise für die Herzinsuffizienz (4), für die koronare Herzerkrankung (5) oder den arteriellen Hypertonus (6) ausführliche Behandlungsempfehlungen zur Verfügung. Abgesehen von einigen nicht-pharmakologischen Maßnahmen, wie z.B. der Koronarangiographie stellen die medikamentösen Therapien neben der Vermeidung schädlichen Verhaltens die Grundpfeiler zur Verbesserung von Mortalität und Morbidität der kardiovaskulären Erkrankungen dar. Bereits für die Auswahl einer geeigneten pharmakologischen Therapie ist ein tiefergehendes Verständnis der zugrundeliegenden physiologischen und pathophysiologischen Prozesse wichtig. Insbesondere zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist jedoch eine profunde Kenntnis der vielen auf zellulärer Ebene ablaufenden Vorgänge und insbesondere deren Verknüpfungen unabdingbar. So

konnten beispielsweise in den letzten Jahren in der Therapie der Herzinsuffizienz mit der Einführung von Valsartan / Sacubitril und Dapagliflozin bzw. Empagliflozin große Fortschritte erzielt werden. (7,8)

1.1.Elektromechanische Kopplung

Wesentlich für das Verständnis vieler pathophysiologischer Prozesse der Herzinsuffizienz, wie auch für die Wirkung vieler Arzneimittel am Herzen ist der Vorgang, durch welchen die elektrische Erregung der einzelnen Herzmuskelzellen in eine mechanische Kontraktion übersetzt wird. Dieser Vorgang wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Nur hierdurch kann das Herz seine Aufgabe erfüllen und das Blut durch den Kreislauf pumpen.

Die physiologischen Vorgänge der elektromechanischen Kopplung sind komplex. Sie beginnt dadurch, dass über das Reizleitungssystem sowie benachbarte Herzmuskelzellen eine elektrische Erregung zu den einzelnen Kardiomyozyten geleitet wird. Hierdurch kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran. Dies aktiviert spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle (L-Typ Calcium-Kanäle) und öffnet diese. Extrazelluläres Calcium strömt durch die Zellmembran entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle ein. Ursächlich hierfür ist ein in Ruhe gewaltiger Unterschied der Calciumkonzentration zwischen intra- und extrazellulärem Raum. In Ruhe beträgt die Calciumkonzentration in der Zelle etwa 10^{-7} Mol/l, im Extrazellulärtraum etwa 10^{-3} Mol/l, also das 10.000-fache.

Dieser Einstrom von extrazellulärem Calcium trägt beim Menschen jedoch nur etwa 30% des gesamten Calciumeinstroms in das Zytosol bei. Der mengenmäßig überwiegende Teil der Calciumfreisetzung findet aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) statt. In dessen Membran sitzen Ionenkanäle (sog. Ryanodin-Rezeptoren), welche bei einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration öffnen und so das in großen Mengen im sarkoplasmatischen Retikulum gespeicherte Calcium in das Zellinnere freisetzen. Es kommt also zu einer calciuminduzierten Calciumfreisetzung. (9)

Durch diese Mechanismen steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration rapide an. Freie Calciumionen können nun an Troponin C binden, wodurch das damit verbundene

Tropomyosin die hochaffine Myosin-Bindungsstelle des Aktins freigibt. Hierdurch kann der Querbrückenzzyklus beginnen und das Herz kontrahiert.

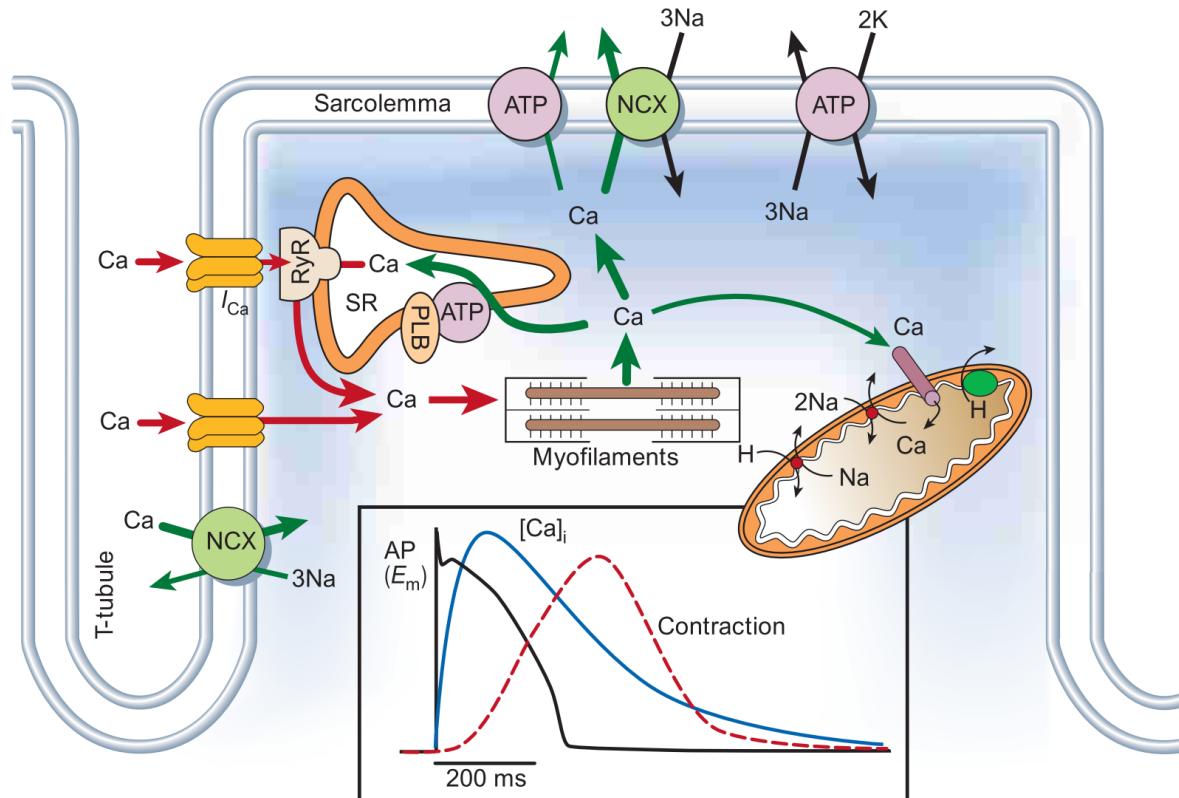


Abbildung 1. Übersicht über den Calciumtransport im Kardiomyozyten. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature aus Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002;415(6868):198–205 (9)

Um die notwendige Relaxation der Kardiomyozyten zu ermöglichen wird Calcium aktiv aus dem Zytosol entfernt. Den hierfür wichtigsten Beitrag (ca. 70% im Menschen) leisten ATPasen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (Sarcoplasmatic Reticulum Ca-ATPase, SERCA), welche Calcium aktiv in das SR zurück überführen. Der zweite quantitativ bedeutende Weg zur Calciumentfernung, wird durch einen Na⁺/Ca²⁺-Antiport in der Zellmembran (Na⁺/Ca²⁺-Exchanger, NCX) ermöglicht. Dieser eliminiert ein Ca²⁺-Ion in den Extrazellulärraum im Austausch gegen einen Einstrom von drei Na⁺-Ionen in die Zelle (ca. 28% im Menschen). (9)

Interessanterweise unterscheiden sich die prozentuellen Anteile des Calciumtransports je nach Spezies deutlich. Bei der im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus verwendeten Maus beispielsweise werden im Gegensatz zu o.g. Zahlen beim Menschen ca. 92% des Calciums via SERCA in das SR zurück transportiert und nur ca. 7% durch den NCX aus dem Zytosol entfernt. (9)

Diese Vorgänge stellen die Grundzüge der elektromechanischen Kopplung dar. Wie wird dieser Ablauf jedoch modifiziert, wenn das Herz unter Belastung binnen kurzer Zeit deutlich mehr Arbeit leisten muss?

1.2. Anpassung an Belastung via β -adrenerge Reaktion: Der PKA-Signalweg

Führend verantwortlich für die kurzfristige Steigerung der Herzleistung bei Stress ist die Aktivierung von β -Adrenozeptoren der Kardiomyozyten: Das unter Belastung ausgeschüttete Adrenalin bindet an die β -Adrenozeptoren und aktiviert daran gekoppelte Gs-Proteine. Diese wiederum aktivieren das membranständige Enzym Adenylatcyclase, welches den Second Messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) bildet. (10) Durch die erhöhten cAMP-Spiegel wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese phosphoryliert direkt einige der an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine. (11)

Die Phosphorylierung der in der Zellmembran gelegenen L-Typ Calciumkanäle durch die PKA führt zu einem vermehrten Calciumeinstrom und somit zu einer verstärkten Kontraktion (positiv inotroper Effekt). (12)

Phospholamban (PLB) ist ein kleines, die Funktion der SERCA regulierendes Protein. In seinem nicht-phosphorylierten Zustand hemmt es deren Funktion. Wird PLB jedoch durch die PKA an der Stelle Ser-16 phosphoryliert, so dissoziert es von der SERCA und deren Funktion nimmt zu (Desinhibition). Dies führt zu einer verstärkten und beschleunigten diastolischen Ca^{2+} -Aufnahme bzw. Rückaufnahme in das SR. Es resultiert zum einen eine beschleunigte Relaxation (positiv lusitroper Effekt), da der intrazelluläre Calciumgehalt schneller gesenkt werden kann. Zudem führt die PLB-16-Phosphorylierung durch die verstärkte Calcium-Aufnahme in das SR zu einer vermehrten Calcium-Beladung des SR, was eine größere systolische Calcium-Freisetzung erlaubt, woraus eine Zunahme der Inotropie resultiert. Die Phosphorylierung des Phospholamban ist hierdurch der wichtigste Faktor für die Zunahme der Kontraktilität und der Relaxationsgeschwindigkeit unter β -adrenerger Stimulation. (9,13)

Die Rolle der Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors (RyR2) an Stelle Ser-2808 durch die PKA wird kontrovers diskutiert. Die hierzu im Jahr 2000 von Marks

aufgestellte These postulierte, dass die Phosphorylierung an dieser Stelle eine vermehrte Calcium-Freisetzung aus dem SR und durch die resultierende Calcium-Depletion des SR letztlich einen negativ inotropen Effekt verursacht. (14) Im Widerspruch dazu konnte diese Beobachtung jedoch von mehreren anderen Arbeitsgruppen nicht wiederholt werden, sodass die Bedeutung der Ser-2808-Phosphorylierung des RyR2 durch die PKA noch nicht abschließend geklärt ist. (15,16)

Eine Phosphorylierung von Troponin I (TnI) durch PKA führt zu einer Beschleunigten Dissoziation des Calciums von TnI und damit zu einer beschleunigten Relaxation (positiv lusitroper Effekt). (13)

Auch das Myosin-bindende Protein-C (MyBP-C) wird durch die PKA phosphoryliert. Über eine noch nicht im Detail verstandene Änderung der Interaktion von MyBP-C mit Aktin und Myosin führt diese Phosphorylierung ebenso zu einer verstärkten Kontraktion sowie beschleunigten Relaxation. (17)

Insgesamt führt das durch β -adrenerge Stimulation in Gang gesetzte Zusammenspiel der Phosphorylierungen von L-Typ Calciumkanälen, Troponin I, MyBP-C und vor allem von Phospholamban durch die PKA zu einer deutlichen Steigerung der Inotropie und Lusitropie.

Als dephosphorylierender Gegenspieler zur PKA fungiert die PP-1, welche die Dephosphorylierung u.a. der oben genannten Zielproteine katalysiert. Dies wird in Abschnitt 1.4 weiter ausgeführt.

1.3. Der CaMKII-Signalweg

Die Serin/Threonin-spezifische Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist ein in vielen verschiedenen menschlichen Zellen vorkommendes Enzym. Neben ihrer Funktion im Herzen spielt die CaMKII beispielsweise bei Lern- und Gedächtnisprozessen, im Immunsystem, als auch bei vielen weiteren Abläufen wie z.B. bei der Magensauresekretion eine wichtige Rolle. (18–21)

Die CaMKII ist ein Holoenzym, das aus 6-12 Monomeren zusammengesetzt ist. Es gibt 4 Isoformen der CaMKII, für welche jeweils ein eigenes Gen codiert: α , β , γ und δ , wobei die CaMKII δ die im Herzen dominierende Isoform ist. (22) Am C-terminalen Ende besitzen die Monomere jeweils eine verbindende Struktur, welche für die

Oligomerisierung verantwortlich ist, während sich zentral, sowie am N-terminalen Ende eine regulierende Einheit befindet. Mit Hilfe der verbindenden Einheit lagern sich die einzelnen Monomere zu einem Tubus-förmigen Oligomer zusammen.

Die CaMKII kann vor allem über zwei Wege aktiviert werden:

1. Mittels Aktivierung durch Ca^{2+} /Calmodulin
2. Durch Autophosphorylierung (anhaltende, Ca^{2+} -unabhängige Aktivität)

Calmodulin (CaM) ist ein kleines, ubiquitär vorkommendes Protein, welches mittels EF-Hand-Motiven 4 Ca^{2+} -Ionen binden kann und dann als Second Messenger wirkt. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bindet an die regulatorische Einheit der CaMKII, welche daraufhin die katalytische Einheit freigibt und somit die Kinase-Aktivität ermöglicht.

Wurde ein CaMKII-Monomer aktiviert, ermöglicht ihr Aufbau als Oligomer eine Besonderheit. Benachbarte CaMKII-Monomere können durch ein aktivierte CaMKII-Monomer selbst an der Stelle Thr-286 phosphoryliert werden (Autophosphorylierung). Auf Grund der zyklischen Anordnung reicht somit prinzipiell die Phosphorylierung eines Monomers aus, sodass im Verlauf alle 6-12 Monomere autophosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung der CaMKII an Thr-286 bewirkt zum einen eine deutlich gesteigerte Affinität zu $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Zusätzlich steigt jedoch auch die Aktivität der Thr-286-phosphorylierten-CaMKII ohne gebundenes $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an (Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung). Die Eigenschaft, die Kinaseaktivität somit auch nach Abfall des Calciumspiegels zu erhalten, ermöglichen es der CaMKII damit gewissermaßen, Aktivierungs-Informationen zu „speichern“. So kann die CaMKII beispielsweise im Herzen die Amplitude und Frequenz von Ca-Spikes integrieren und in unterschiedliche Level von Kinase-Aktivität „übersetzen“, auch nachdem der ursprüngliche Calcium-Anstieg bereits wieder abgeflaut ist. (22,23)

Die von der aktivierte CaMKII im Herzen phosphorylierten Zielproteine zeigen teils große Überlappung mit den Zielproteinen der PKA, oft auch mit benachbarten Phosphorylierungsstellen. So wird durch die CaMKII beispielsweise ebenfalls der L-Typ Calcium-Kanal phosphoryliert, wodurch dessen Offenwahrscheinlichkeit steigt und auf Grund des gesteigerten Calcium-Einstroms eine Zunahme der Inotropie resultiert. (24)

PLB wird von der CaMKII an Stelle Thr-17 phosphoryliert, wodurch dieses, analog zur benachbarten, PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLB, von der SERCA dissoziiert und die Hemmung der SERCA entfällt. Dies hat wie bereits bei der PKA beschrieben einerseits auf Grund der beschleunigten Calcium-Rückaufnahme in das SR einen positiv lusitropen Effekt. Zum anderen resultiert aus der zunehmenden Calcium-Beladung des SR eine verstärkte Kontraktionskraft. (24,25)

Der Ryanodin-Rezeptor (RyR2) wird durch die CaMKII an Stelle Ser-2814 phosphoryliert. Aus der vermehrten Calcium-Freisetzung könnte unter physiologischen Bedingungen ein positiv inotroper Effekt resultieren. (26–28) Im pathophysiologischen Kontext führt die Hyperphosphorylierung des RyR2 an dieser Stelle jedoch zu einem diastolischen Calcium-Leck aus dem SR, was mit Rhythmusstörungen sowie SR-Calcium-Depletion und dadurch verminderter systolischer Kontraktionskraft in Verbindung gebracht wird. (24,29,30)

1.4. Proteinphosphatasen als Gegenspieler der Kinasen

Die durch die Proteinkinasen angefügten Phosphorylierungen befinden sich *in vivo* in einer fein abgestimmten Balance aus Aufbau und Abbau. Als Gegenspieler der Kinasen wirken hier die Proteinphosphatasen. Diese katalysieren enzymatisch die Abspaltung der Phosphatgruppen.

Es gibt vier wesentliche Klassen an Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen:

- Proteinphosphatase 1 (PP-1)
- Proteinphosphatase 2A (PP-2A)
- Proteinphosphatase 2B (PP-2B, Synonym: Calcineurin)
- Proteinphosphatase 2C (PP-2C) (31)

Im Herzen entfalten vor allem die PP1 und die PP2A ihre Wirkung auf die oben genannten Ziele der PKA und CaMKII, während die PP2B mehr eine Regulation von Transskriptions-Signalwegen bewirkt. (32)

Im Genom überwiegt die Anzahl der verschiedenen Kinasen die der Phosphatasen deutlich. Um dennoch eine gezielte Anpassung der Phosphatase-Aktivität zu ermöglichen, geht die katalytische Untereinheit der PP-1 (PP1c) Komplexe mit

verschiedenen regulatorischen Untereinheiten ein. Hierdurch kann beispielsweise die Substratspezifität, die subzelluläre Lokalisation oder auch die Regulation auf vielfältige Art und Weise beeinflusst werden. (33)

Experimentell konnte gezeigt werden, dass in der humanen Herzinsuffizienz die Aktivität der PP-1 gesteigert ist, wodurch eine verminderte Phosphorylierung des PLB und dadurch eine verminderte Kontraktilität resultiert. (34,35)

Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine dreifache Überexpression der PP-1 zum klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie mit reduzierter Pumpfunktion und erhöhter Sterblichkeit führt. Daher wurde zwischenzeitlich diskutiert, ob nicht eine Inhibition der PP-1 einen nützlichen medikamentösen Therapieansatz bei Herzinsuffizienz darstellen könnte. (36)

Die katalytische Untereinheit der PP-1 liegt in drei Isoformen vor: PP1 α , PP1 β und PP1 γ . In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der α - und γ -Isoform kaum einen Einfluss auf den Phänotypen hatte. Der PP1 β -Knockout hingegen führte am isolierten Kardiomyozyten zwar zu einer gesteigerten Kontraktilität, am gesamten Herzen zeigte sich im Gegensatz dazu jedoch ein strukturelles Remodelling mit interstitieller Fibrose. Interessanterweise waren in allen drei Knockout-Modellen die Phosphorylierung des PLB und die Calciumtransienten im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Als Erklärung für die beobachteten Unterschiede wurde eine gesteigerte Phosphorylierung der Myofilamente, insbesondere des Myosins, im PP1 β -Knockout gefunden. Zusätzlich scheint es zu einer kompensatorischen Steigerung der α - und γ -Isoform beim Knockout der PP-1- β zu kommen, welche den Verlust der β -Isoform jedoch nicht vollständig ausgleichen kann. Somit scheint die Inhibition der PP-1 nicht direkt als therapeutisches Ziel bei Herzinsuffizienz von Nutzen zu sein. (37,38)

1.5. Proteinphosphatase-1-Inhibitor-1

Die an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteine werden also wesentlich über Phosphorylierung (Kinasen) bzw. Dephosphorylierung (Phosphatasen) reguliert. Das Protein Proteinphosphatase-1-Inhibitor-1 (Inhibitor-1) spielt hierbei eine relevante Rolle: Inhibitor-1 hemmt hochspezifisch die PP-1 und wird PKA-abhängig durch Phosphorylierung an Thr-35 aktiviert. (39–41) Inhibitor-1 wirkt somit als ein verstärkendes Element in der β -adrenergen Signalkaskade. (42)

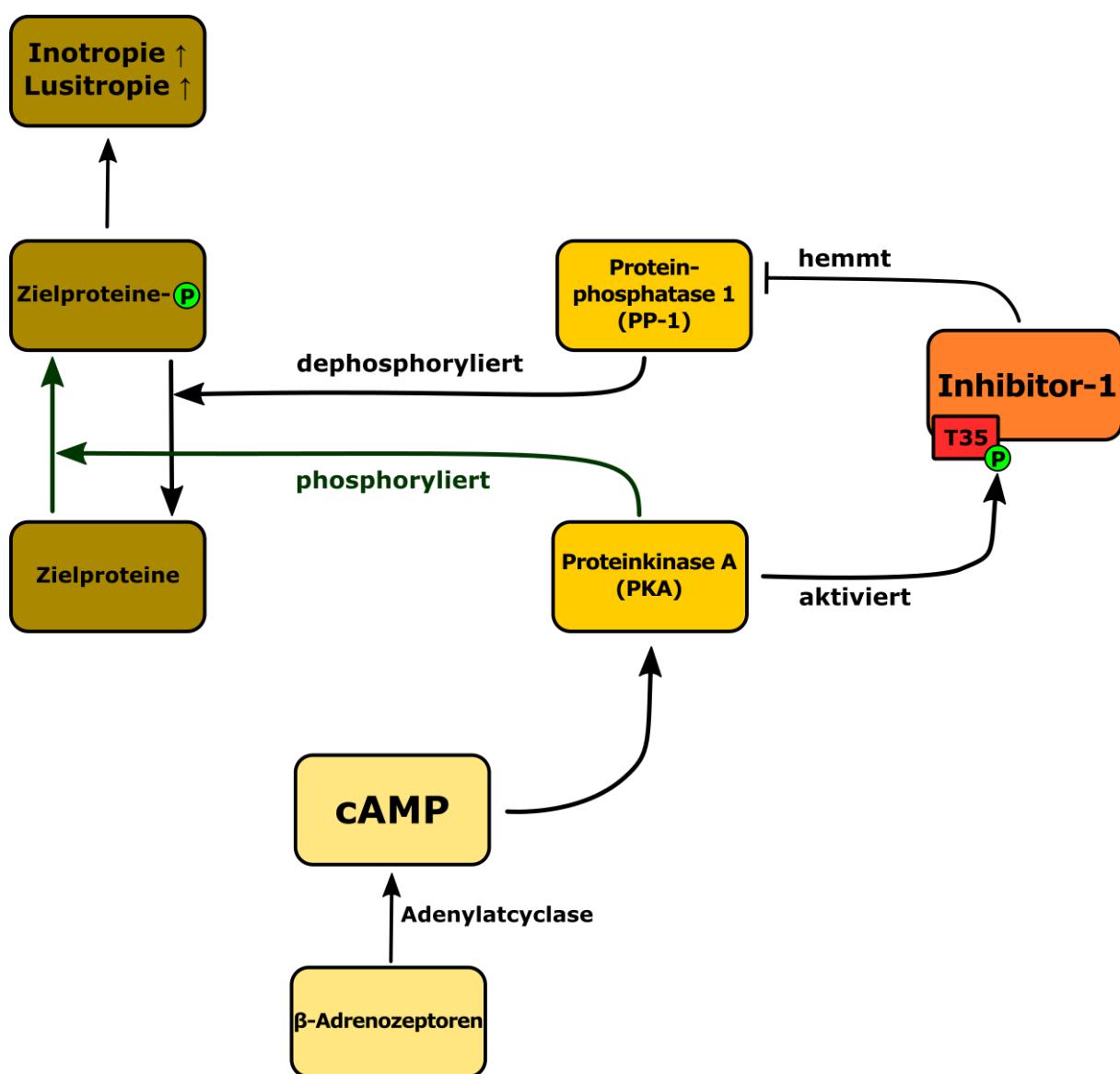


Abbildung 2. Funktion von Inhibitor-1 als verstärkendes Element der beta-adrenergen Signalkaskade.

Inhibitor-1 (I-1) wurde erstmals 1976 in der Skelettmuskulatur von Hasen nachgewiesen (43). Es ist ein vergleichsweise kleines Protein mit einer Molekulmasse von 27 kDa bestehend aus 171 Aminosäuren, welches neben dem Herzen in vielen verschiedenen anderen Geweben vorkommt. (44–47) NMR-Untersuchungen zeigten, dass abgesehen von vier kurzen helikalen Elementen der Großteil des Moleküls ohne erkennbare Struktur ist. (48) Neben Thr-35 sind zwei weitere Phosphorylierungsstellen von Inhibitor-1 bekannt: An Ser-67 (49) sowie an Thr-75 (50) kann Inhibitor-1 durch die Proteinkinase-C α phosphoryliert werden. Diese beiden Phosphorylierungen führen zu einer verminderten Hemmung der PP1 durch Inhibitor-1. Diese Wirkungsabschwächung resultiert daraus, dass nach der Phosphorylierung von Ser-67 und / oder Thr-75 die Phosphorylierung von Thr-35 (durch die PKA) und somit die Aktivierung von Inhibitor-1 erschwert wird. (51,52) Die Dephosphorylierung von Inhibitor-1 erfolgt in den Kardiomyozyten durch die Proteinphosphatasen 2A und 2B. (53)

Zur Untersuchung der Bedeutung von Inhibitor-1 wurde ein Mausmodell mit genetischem Knockout von Inhibitor-1 erschaffen („I-1 KO“). Mäuse ohne Expression von Inhibitor-1 haben unter Ruhebedingungen unveränderte Phosphorylierungsniveaus sowie eine normale Kontraktilität im Vergleich zum Wildtyp. Unter Belastung zeigt sich jedoch eine leicht eingeschränkte Kontraktilitätszunahme, passend zu der Bedeutung von Inhibitor-1 als Verstärker des β -adrenergen Signalwegs. (36,54)

Es wurden mehrere Studien durchgeführt, welche untersuchten, ob Inhibitor-1 eher einen schädlichen oder nützlichen Einfluss bei pathologischen Veränderungen hat.

Deutliche Überexpression von Inhibitor-1 (200-fach im Vergleich zum Wildtyp) führte in Mäusen zu einer kardialen Hypertrophie und Dysfunktion. (54) In einer anderen Studie zeigten Mäuse mit einer 25-fachen Überexpression von Inhibitor-1 unter katecholaminergem Stress eine verstärkte Arrhythmieneigung, sowie im Alter die Entwicklung einer Kardiomyopathie. (55) In einer weiteren Studie wurden Mäuse, die künstlich mittels Verengung der Aorta eine erhöhte Nachlast hatten (sogenannte TAC-Mäuse, *transverse aortic constriction*), mit einer adenovirale vermittelten Expression

von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 behandelt. Diese Mäuse zeigten eine vermehrte Hypertrophie sowie eine eingeschränkte Kontraktilität. (56)

Im Gegensatz zu den soeben genannten Studien, zeigten andere Untersuchungen protektive Effekte von Inhibitor-1. Beispielsweise kam es in einer weiteren Studie mit TAC-Mäusen nach der Expression von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem Ausbleiben der Verschlechterung der kardialen Funktion. (57) In einem Mausmodell mit induzierter kardialer Ischämie kam es durch adenoviral induzierte Expression von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 zu einer Wiederherstellung der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. (58) In einer weiteren Studie wurde Schweinen mit künstlich verursachtem Myokardinfarkt im weiteren Verlauf konstitutiv aktives Inhibitor-1 via adenoviralem Vektor (intrakoronare Gabe) induziert. Die so behandelten Tiere hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere myokardiale Narbengröße und keine weitere Verschlechterung der Pumpfunktion. (59) Eine andere Studie an Schweinen untersuchte den Einfluss von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 nach der Induktion einer Volumenbelastung mittels Mitralinsuffizienz. Hier zeigte sich in der Interventionsgruppe eine Verbesserung der Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. (60)

Zusammenfassend muss man also feststellen, dass bisher nicht abschließend geklärt ist, ob Inhibitor-1 im Herzen eher schädliche oder nützliche Effekte vermittelt. Vermutlich ist die Wirkung von Inhibitor-1 stark kontextabhängig, sodass es am ehesten als ausbalancierendes Element in der Signalkaskade gesehen werden kann. Trotz der bisher scheinbar widersprüchlichen Datenlage bleibt Inhibitor-1 damit weiterhin ein interessantes therapeutisches Ziel für pharmakologische Therapien.

Interessanterweise wurde beim Menschen ein Polymorphismus im Gen für Inhibitor-1 entdeckt. Bei ca. 7% der Bevölkerung ist das normalerweise an Stelle 109 vorkommende Glycin gegen Glutaminsäure getauscht. (61) Diese mutierte Variante von Inhibitor-1 bindet schlechter an die Protein-Phosphatase-1 als die Wildform. Hieraus resultiert im Mausmodell eine eingeschränkte kardiale Funktion sowie eine Arrhythmieneigung. Bei den betroffenen Patienten war jedoch kein spezieller Phänotyp zu erkennen.

Mehrere Studien an Mausmodellen lieferten Hinweise auf eine unterschiedliche subzelluläre Regulation von Inhibitor-1. Wäre Inhibitor-1 und sein Einfluss auf die PP-1

im gesamten Kardiomyozyten homogen verteilt, so wäre eine gleichsinnige Beeinflussung aller Zielproteine der PP-1 zu erwarten. In mehreren Studien mit Überexpression von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 konnte eine deutliche Zunahme der PLB-Ser-16-Phosphorylierung gezeigt werden. An anderen Zielproteinen des PKA-Signalweges, wie beispielsweise am Ryanodinrezeptor oder an Troponin-I, konnte jedoch *keine* Zunahme der PKA-abhängigen Phosphorylierungen beobachtet werden. (55,57,58) Umgekehrt zeigte sich im I-1-Knockout-Modell nur an der PLB-S16-Stelle eine reduzierte Phosphorylierung. (54) Die hierfür plausibelste Erklärung liegt in einer unterschiedlichen Verteilung von Inhibitor-1 in den subzellulären Kompartimenten. (51) Dies ist der Grund warum in der hier vorgestellten Arbeit nicht nur der Phosphorylierungsstatus eines einzigen PKA-Zielproteins betrachtet wird, sondern mehrere verschiedene Proteine der elektromechanischen Kopplung untersucht werden (Ryanodinrezeptor, L-Typ-Calciumkanal, Phospholamban).

1.6. Verknüpfung zwischen PKA- und CaMKII-Signalweg

Vergleicht man die Zielproteine des PKA- sowie des CaMKII-Signalweges, fällt eine große Übereinstimmung auf, jedoch erfolgen die Phosphorylierungen innerhalb des jeweiligen Proteins an anderer Stelle. (24)

In bislang unpublizierten Vorversuchen für die vorliegende Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass eine (adenoviral in Zellkultur) vermehrte Aktivität von I-1 zu vermehrter CaMKII-Aktivierung führt (Prof. Ali El-Armouche, Institut für Klinische Pharmakologie, Technische Universität Dresden). Zudem wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung der CaMKII-spezifischen Ser-2814-Stelle des RyR2 I-1-abhängig reguliert ist. (62) Es scheint damit, dass die I-1-Aktivität einen Einfluss auf die Aktivität der CaMKII oder zumindest den Phosphorylierungsgrad von CaMKII-Zielen hat. Ob umgekehrt eine wechselwirkende Regulation der I-1-Aktivität durch die CaMKII besteht, war nicht bekannt, auch wenn die in CaMKII δ -Knockout Mäusen festgestellte erhöhte Expression von I-1 (63) dies plausibel erscheinen ließ. Und tatsächlich konnte in weiteren bislang unpublizierten Vorversuchen mittels radioaktiv markierten Phosphors (^{32}P) gezeigt werden, dass die CaMKII I-1 potent phosphorylieren kann. Das heißt, die Übertragung des markierten Phosphors auf I-1 erfolgte nur in Anwesenheit von CaMKII (Prof. Kristina Lorenz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg, Abbildung 3).

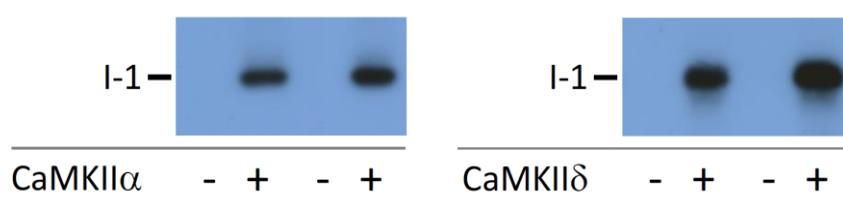


Abbildung 3. Phosphorylierung von Inhibitor-1 durch CaMKII, gezeigt mittels radioaktiv markierten Phosphors. (Prof. Kristina Lorenz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg)

Zur weiteren Klärung, welche genauen Stellen von I-1 dabei durch die CaMKII phosphoryliert werden, wurden (ebenfalls bislang unpublizierte) Untersuchungen mittels Massenspektrometrie durchgeführt (Prof. Kristina Lorenz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg). Hierbei konnten mehrere Stellen identifiziert werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Phosphorylierungsziele der CaMKII darstellen: Thr-42, Ser-46, Ser-47, Thr-75, Thr-78, Thr-110, Thr-136 (siehe Abbildung 4).

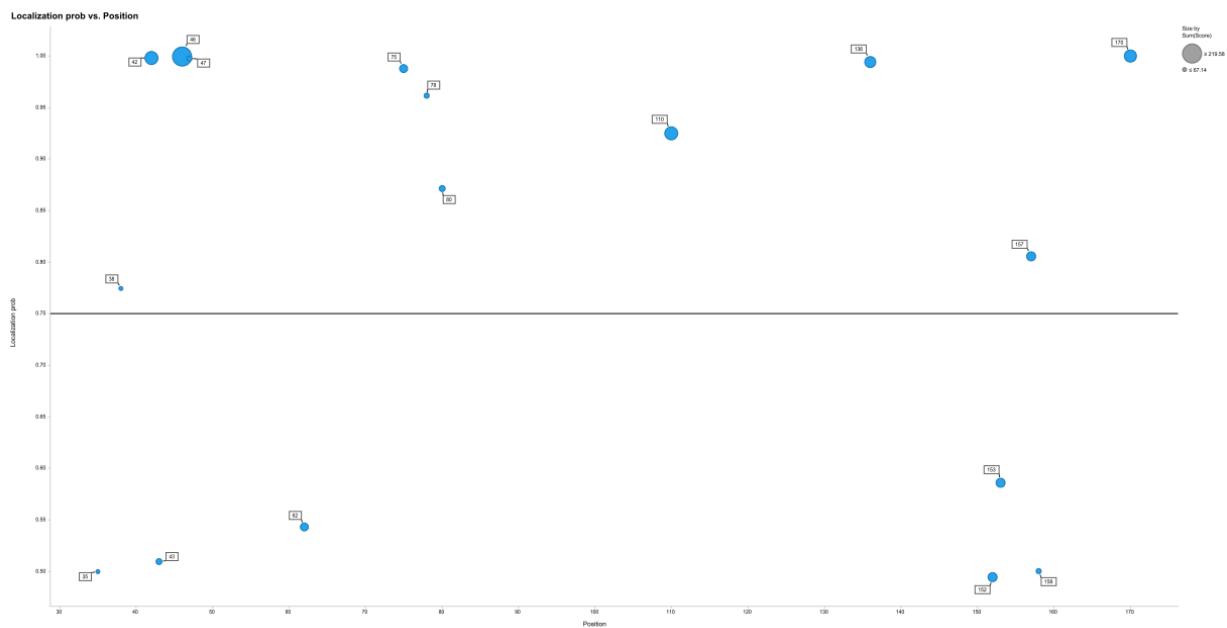


Abbildung 4. Ergebnisse der Massenspektrometrie. (Prof. Kristina Lorenz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg)

Ob diese Phosphorylierungsstellen von I-1 aber tatsächlich auch eine physiologische Relevanz haben, war bislang unbekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

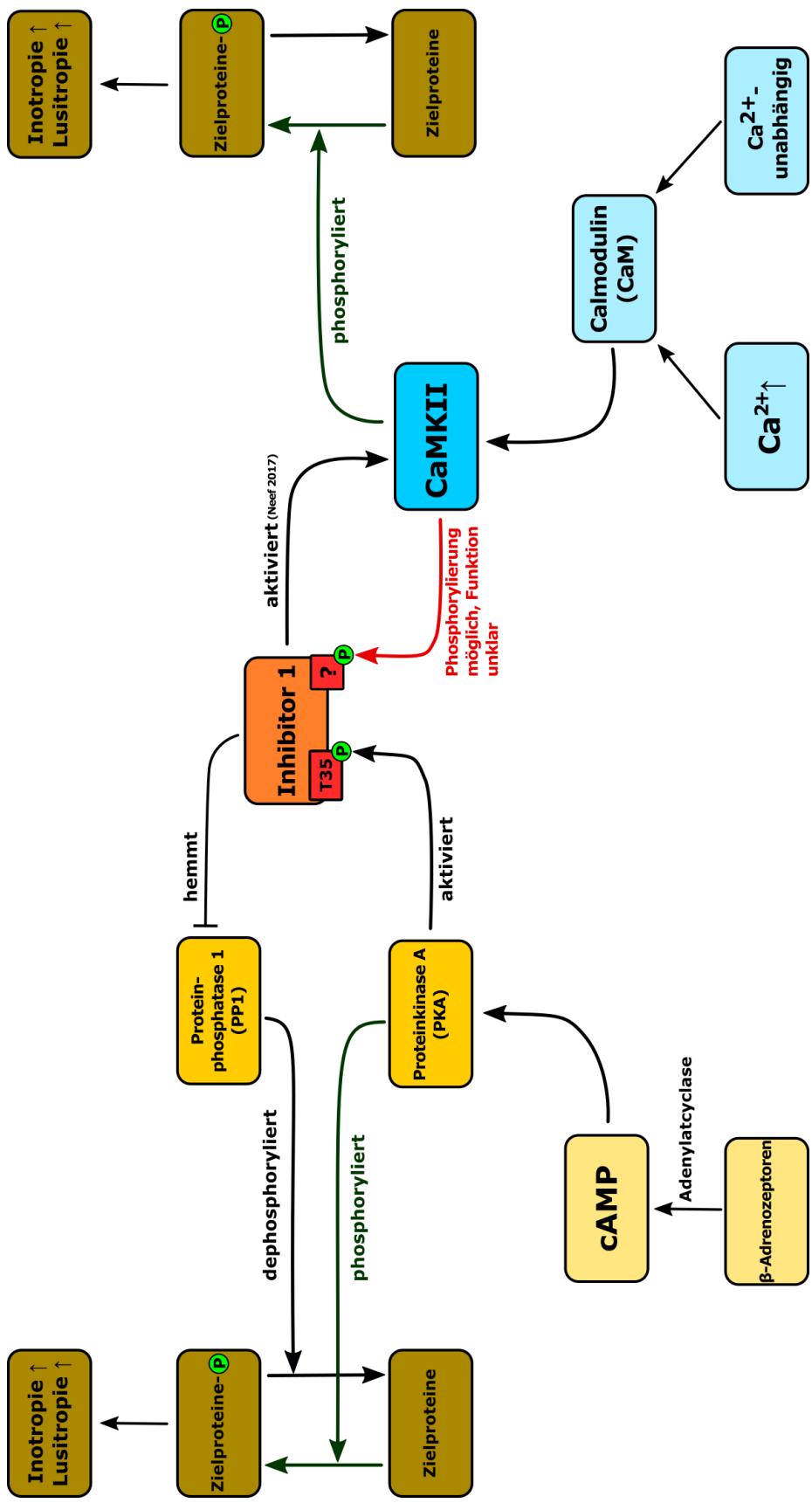


Abbildung 5. Verknüpfung des PKA- und des CaMKII-Signalwegs durch Inhibitor-1.

1.7. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, festzustellen, ob diese neu identifizierten CaMKII-Phosphorylierungsstellen von I-1 (Thr-42, Ser-46, Ser-47, Thr-75, Thr-78, Thr-110 und Thr-136) in Kardiomyozyten einen Einfluss auf dessen Funktion bzw. nachgeordnet die Aktivität der PP-1 haben. Dies soll anhand des Phosphorylierungsgrades ausgewählter, durch die PP-1 dephosphorylierter Proteine (Targets von entweder PKA und/oder CaMKII) untersucht werden. Weiterhin soll festgestellt werden, ob die (durch phosphomimetische Mutation simulierte) Phosphorylierung von I-1 an einer dieser Stellen in umgekehrter Richtung einen Einfluss auf die Aktivität der CaMKII hat.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde die Hypothese postuliert, dass I-1 an Thr-42, Ser-46, Ser-47 oder Thr-136 (durch die CaMKII) phosphoryliert werden kann und dass ...

1. ... die Phosphorylierung von I-1 an einer dieser Stellen seine Funktion beeinflusst, was sich in veränderter Aktivität der PP-1 bzw. dem Phosphorylierungsgrad von durch die PP-1 dephosphorylierten Proteinen niederschlägt.
2. ... insbesondere die Phosphorylierung von I-1 an einer dieser Stellen einen Einfluss auf die Aktivität der CaMKII bzw. den Phosphorylierungsgrad von CaMKII-Targets hat.

2. Material und Methoden

2.1. Isolation, Kultivierung und Transfektion muriner Kardiomyozyten

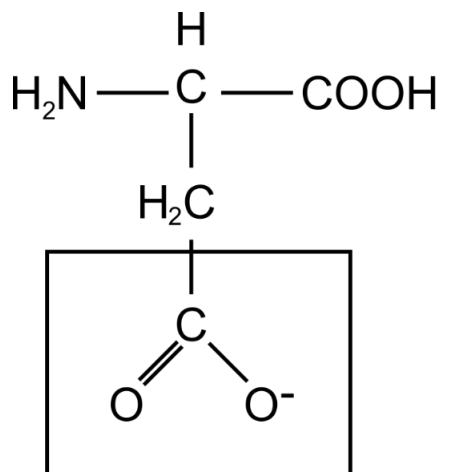
2.1.1. Vorbereitungen Zellkultur

Zur optimalen Anhaftung der Kardiomyozyten auf den Zellkulturschalen wurde Laminin verwendet. Hierzu wurde in die verwendeten Kulturschalen (*cellstar 35 x 10 mm, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich*) unter sterilen Bedingungen jeweils 120 µl 1:10 verdünnte Laminin-Lösung (*Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, verdünnt mit sterilem NaCl 0,9%*) gegeben und mit einem sterilen CellScraper über den gesamten Boden verteilt. Aus hygienischen Gründen wurden die eigentlichen Zellkulturschalen in größeren Schalen aufbewahrt (*Primaria 100 mm x 20 mm, Corning Inc., Corning, USA*). Zur Antrocknung der Lamininschicht wurden die Kulturschalen über Nacht bei +4 °C im Laborkühlschrank gelagert.

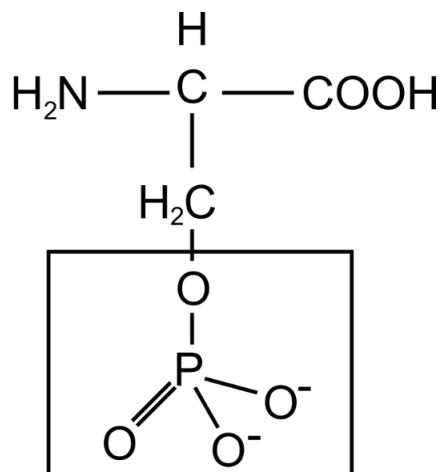
2.1.2. Generierung der Viren

Die Generierung der Adenoviren erfolgte freundlicherweise durch Prof. Dr. Kristina Lorenz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg: Zur Expression der veränderten Varianten von I-1 in den kultivierten Kardiomyozyten wurde als Vektor Humanes Adenovirus Typ 5 verwendet.

Das verwendete Virus wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits *pAd/CMV/V5-DEST-Vektor (Invitrogen / ThermoFisher, Waltham, USA)* hergestellt. Er bindet an den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor der Kardiomyozyten und wird danach internalisiert. (64) Mit Hilfe eines vorgeschalteten Promoters werden im Anschluss transient die gewünschten Varianten von I-1 exprimiert. Neben einer Variante, welche für die im normalen Säugetierherzen vorkommende Form von I-1 (Wildtyp) codiert, wurden die phosphomimetisch mutierten Varianten erstellt. Das heißt, dass an den als relevant erachteten Phosphorylierungsstellen die dort im Wildtyp vorkommenden Aminosäuren Serin bzw. Threonin gegen Asparaginsäure ausgetauscht wurden. Durch die so dauerhaft vorhandene negative Ladung der Carboxygruppe wird das Protein biochemisch so beeinflusst, als wäre es dauerhaft an der Substitutionsstelle phosphoryliert.



Asparaginsäure



Phospho-Serin

Abbildung 6. Asparaginsäure zeigt eine ähnliche Ladungsverteilung wie Phospho-Serin. Modifiziert nach <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phosphomimetics.svg>, abgerufen am 04.06.2023.

2.1.3. Isolation adulter muriner Kardiomyozyten

23 bis 32 Wochen alte Mäuse der Zuchtlinie S571E (BL/6J Hintergrund) wurden durch einen Technischen Assistenten mit Isofluran narkotisiert und nach dem raschen Einsetzen der Bewusstlosigkeit mittels cervicaler Dislokation getötet. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die rasche Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle. Mittels einer Insulinkanüle (30G / 0,3mm) erfolgte direkt im Anschluss die Injektion von 200 IE unfraktionierter Heparins (*Heparin 25.000 IE / 5 ml, Rotexmedica / Panpharma, Luitré-Dompierre, Frankreich*) in den linken Ventrikel, sowie die Entnahme des Herzen einschließlich proximaler Aorta. Die Masse der Herzen wurde im Anschluss durch Wiegen bestimmt. Ohne weitere Verzögerung wurden die Herzen dann in die laboreigene Langendorff-Perfusions-Anlage eingebracht. (65)

Hierzu wurde die Aorta der Herzen vorsichtig retrograd mit einer stumpfen Kanüle kanüliert und mittels eines vorgelegten Fadens sowie eines Metall-Clips an der Kanüle fixiert. Im Anschluss wurden die Herzen in eine auf 37°C temperierte Kammer eingebracht. Die Koronarien wurde über die Aorten-Kanüle mit ebenfalls per Wärmetauscher auf 37°C temperierter Lösung mit einem Fluss von 3 ml/min perfundiert. Die ersten 4,5 Minuten erfolgte die Perfusion mittels enzymfreier Lösung (Isolationstyrode, Zusammensetzung siehe Tabelle 1). Im Anschluss erfolgte für weitere 4 Minuten die Perfusion mit enzymhaltiger Verdauungslösung

(Zusammensetzung siehe Tabelle 2). Hierdurch wird erreicht, dass sich die Verbindungen zwischen den einzelnen Kardiomyozyten lösen. Durch die Verteilung der Verdauungslösung über die Koronararterien und die Gefäße des Myokards in das Gewebe wird ein besonders homogener Verdau erreicht.

Nach Ende der Verdauzeit wurden die Herzen von der Langendorff-Anlage gelöst. Die Vorhöfe wurden mittels einer Schere abgetrennt. Das restliche Herz wurde in eisgekühlte Stopp-Lösung eingetaucht (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) und sofort vorsichtig mit einer Schere zerkleinert, sowie mehrmals auf- und abpipettiert. Dies diente dem möglichst schnellen Stopp des enzymatischen Verdaus, sowie der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes. Die im fetalen Kälberserum der Stopp-Lösung enthaltenen Proteaseinhibitoren unterbinden ein unkontrolliertes Fortlaufen des enzymatischen Verdaus. Die Zellsuspension wurde von den übrig gebliebenen, größeren Geweberesten mittels Filtrierens durch ein feinmaschiges Netz getrennt.

Isolationstyrode		
Substanz	Konzentration	Hersteller
NaCl	113 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaHCO ₃	12 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
KHCO ₃	10 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	4,6 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,2 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O	0,6 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	0,6 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	5,5 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
Taurin	30 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	10 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
BDM	10 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 1. Zusammensetzung der Isolationstyrode.

Verdaulösung		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Isolationstyrode		
Liberase	250 mg/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	55,6 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl ₂	12,5 µmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 2. Zusammensetzung der Verdaulösung.

Stopp-Lösung		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Isolationstyrode		
BCS	10 Vol.-%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl ₂	13,89 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 3. Zusammensetzung der Stopp-Lösung.

2.1.4. Kultur adulter muriner Kardiomyozyten

Der Verdau der Herzen erfolgt in einer weitgehend calciumfreien Lösung. Dies ermöglicht das Auseinanderlösen der Zellen an den Glanzstreifen und schützt die Zellen vor übermäßigen Kontraktionen. (66) Anschließend mussten die Kardiomyozyten schrittweise an eine normale extrazelluläre Calciumkonzentration gewöhnt werden („Calciumaufbau“). Als ersten Schritt hierfür wurde die Zellsuspension für 8 Minuten bei Raumtemperatur senkrecht in einem 15ml Falcon-Tube stehen gelassen, wodurch sich auf Grund von Sedimentation am Boden ein Zellpellet bilden konnte. Der Überstand wurde dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Direkt danach wurden 5 ml einer sterilen Aufbau-Lösung (Isolationstyrode mit 5 Vol.-% BCS) mit im ersten Schritt 0,1 mM Calcium hinzugegeben und das Pellet mittels vorsichtigen Schwenkens resuspendiert. In drei weiteren gleichartig durchgeführten Schritten wurde nach jeweils 8 Minuten Wartezeit die Calciumkonzentration auf 0,2 mM, 0,4 mM und schließlich auf 0,8 mM Calcium erhöht. Beginnend mit dem Hinzufügen der 0,8 mM Calciumlösung wurden dieser und alle nachfolgenden Schritte der Zellkultur in einer sterilen S2-Sicherheitswerksbank durchgeführt. Diese durfte freundlicherweise im Rahmen einer Kollaboration mit der

Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungs chirurgie (Prof. Dr. Prantl) genutzt werden.

Zur Erhöhung der nutzbaren Proteinmenge wurden jeweils die aus zwei Mäuseherzen isolierten Zellen zu einem Versuchsansatz kombiniert. Technisch erfolgte dies durch die zeitlich ca. 10 Minuten versetzte Isolation zweier Herzen. Der Calciumaufbau mit den Kardiomyozyten der zuerst isolierten Maus wurde bis zum 0,8 mM-Schritt ohne unnötige Verzögerungen durchgeführt. Dann wurde eine kurze Pause notwendig, bis die Zellen des zweiten Herzens nach der Sedimentationszeit ebenfalls ein Pellet in der 0,8 mM Calciumlösung gebildet hatten. Daraufhin wurde der Überstand in beiden Röhrchen mit einer Pasteurpipette abgenommen. Zu einem der beiden Pellets wurden 15 ml Plattiermedium (MEM „*Minimal Essential Medium*“ mit „*Hanks Salzen*“ plus Zusätze, siehe Tabelle 4) gegeben und die Zellen durch Schwenken resuspendiert. Diese Suspension wurde vorsichtig in das zweite Röhrchen gegeben und dessen Zellen ebenfalls resuspendiert. Das Plattiermedium wurde mit 2,3-Butanedionmonoxim versetzt um übermäßige Kontraktionen zu verhindern (67), sowie mit fetalem Kälber serum um die letzten Reste von Verdauungsenzymen sicher zu inaktivieren.

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahlen der jeweiligen Kultur wurden nach sehr gründlichem, jedoch vorsichtigem Durchmischen mit einer Eppendorf-Pipette 5-6 Tropfen von je 5 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben.

Plattiermedium			
Substanz	Zugabe	Konzentration	Hersteller
MEM Hank's			Biochrom, Berlin
L-Alanyl-L-Glutamin	2%	200 mM	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	0,1%	10.000 IE/ml, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2,3-Butanedionemonoxime	2%	500 mM	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
FCS	5%		GE Healthcare, Chicago, USA

Tabelle 4. Zusammensetzung des Plattiermediums.

Kulturmedium				
Substanz	Zugabe	Konzentration	Hersteller	
MEM Hank's			Biochrom, Berlin	
L-Alanyl-L-Glutamin	2%	200 mM	Biochrom, Berlin	
Penicillin/Streptomycin	0,1%	10.000 IE/ml, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
Insulin-Transferrin-	0,001%	100x	gibco / Thermo-Fisher,	
Selenium-Sodium Pyruvate			Waltham, USA	

Tabelle 5. Zusammensetzung des Kulturmediums.

Im Anschluss wurden die im Plattiermedium suspendierten Zellen gleichmäßig in sechs vorbereitete Zellkulturschalen (siehe Kapitel 2.1.1) verteilt. Hierzu wurden mit einer serologischen Pipette vorsichtig 2,5 ml der Lösung in jede Kulturschale gegeben. Zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen über den Schalenboden erfolgten vorsichtige Schwenkbewegungen in der Form einer Acht. Im Anschluss wurden die Schalen für zwei Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 Vol.-% CO₂ gelagert. Diese Zeit diente dem möglichst vollständigen Anhaften der Kardiomyozyten am Laminin-beschichteten Schalenboden.

2.1.5. Ermittlung der Zellzahl

Da die Anzahl der in einer Isolation gewonnenen Kardiomyozyten von Isolation zu Isolation erheblichen Schwankungen unterliegt, musste deren Zahl für jeden einzelnen Versuch jeweils nach dem Calciumaufbau bestimmt werden. Nur so konnte für eine definierte Zellzahl immer die gleiche Virusmenge zugeben werden und somit eine über die Versuchsgruppen hinweg gleichmäßige Expression von I-1 bzw. Multiplizität der Infektionen sichergestellt werden. Hierfür wurden die zuvor entnommenen 5 µl Tropfen der Zellsuspension auf den Objekträgern genutzt. Diese Tropfen wurden mittels einer geeigneten Vergrößerungsstufe im Lichtmikroskop in einem einzigen Gesichtsfeld dargestellt und fotografiert. Diese Fotos wurden am PC mit dem Programm ImageJ (Version 1.51u, Wayne Rasband) geöffnet und mit Hilfe des Multipoint-Werkzeugs die morphologisch intakten Kardiomyozyten (Kriterien: längliche Form, keine übermäßige

Abrundung erkennbar) gezählt. Aus jeweils drei gezählten Tropfen wurde der Mittelwert berechnet und mit folgender Formel auf die Anzahl der Zellen pro Kulturschale geschlossen:

$$\text{Zellzahl pro Kulturschale} = \frac{15000 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} \cdot \frac{\text{Mittelwert vitaler Zellen}}{6}$$

2.1.6. Virustransfektion

Um die jeweiligen Effekte der verschiedenen Phosphorylierungsstellen optimal untersuchen zu können, wurden als Grundlage Mäuseherzen mit einem Knockout von I-1 gewählt. Somit war es möglich in Abwesenheit der endogenen I-1-Variante durch Adenovirus-vermittelte Expression einer phosphomimetisch aktiven Variante von I-1 isoliert den Effekt dieser spezifischen Mutante zu untersuchen. Wären im Gegensatz hierzu Herzen aus Wildtyp-Mäusen verwendet worden, so hätte sich nach der Transfektion ein Mischbild aus Effekten des endogen I-1 (Wildtyp) und der durch das jeweilige Virus exprimierten, phosphomimetisch aktiven Variante gezeigt. Hierdurch wären Effekte der Mutation zu mindestens überlagert worden. Um die jeweilige Kontrollgruppe (= Wildtyp) und Vergleichsgruppe (= phosphomimetisch aktive Variante) gleich zu behandeln wurde auch Wildtyp I-1 mittels eines Virus in den I-1-Knockout Kardiomyozyten exprimiert.

Auf Grund des konstitutiv nur niedrig exprimierten Levels von I-1 wurde auf eine moderate, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen 3-fache Überexpression des adenoviral induzierten I-1 in den transfizierten Zellen aus I-1-Knockout Mäusen gezielt, um auch bei geringen Effekten der einzelnen Phosphorylierungsstellen einen Effekt nachweisen zu können.

Die hierfür notwendige Menge an Virus musste in Vorversuchen bestimmt werden, da die vorliegenden Viruskonzentrationen unbekannt waren. Hierzu wurden empirisch Zellkulturen von I-1-Knockout Kardiomyozyten mit verschiedenen Mengen der Virus-Arbeitslösung inkubiert. Diese Zellkulturen wurden dann mittels Western-Blot auf I-1 untersucht. Zum quantitativen Vergleich wurden gleichzeitig Zellkulturen aus Wildtyp-Mäusen untersucht. Hierdurch konnte ermittelt werden, welche Menge an Virus-Arbeitslösung notwendig war um die im Vergleich zum Wildtyp dreifache Menge an I-1 zu exprimieren (siehe Kapitel 3.2.1 bzw. Kapitel 3.2.2).

Zur Transfektion der Kardiomyozyten mit den Viren wurde das oben aufgeführte Kulturmedium (*MEM Hank's + Zusätze, siehe Tabelle 5*) vorbereitet. Kurz vor der Verwendung wurde pro 10.000 vitaler Kardiomyozyten je Schale von der jeweiligen Virusarbeitslösung folgende (nach oben beschriebenem Vorgehen bestimmte, siehe auch Kapitel 3.2.1 bzw. Kapitel 3.2.2) Menge zum Kulturmedium hinzugegeben:

Wildtyp	Thr-42	Ser-46	Ser-47	Thr-136
3,42 µl	2,09 µl	2,65 µl	1,86 µl	0,71 µl

Tabelle 6. Verwendete Mengen der jeweiligen Viruslösungen.

Nach Ablauf der 2 Stunden Plattierzeit (Anheften der Zellen) wurde das dafür verwendete Medium vorsichtig entfernt, indem die Schalen gekippt und mit einer Eppendorf-Pipette das überstehende Medium vorsichtig am Rand abgenommen wurde. Hierbei wird gleichzeitig ein Großteil der avitalen Zellen mit dem Überstand entfernt. Das virushaltige Kulturmedium wurde unmittelbar im Anschluss langsam und vorsichtig hinzugegeben und die Zellkulturschalen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 Vol.-% CO₂ in den Inkubator gegeben.

2.1.7. Lyse der Zellen

Nach Ablauf von 24 Stunden erfolgte die Lyse der Zellkulturen. Hierzu wurde die in Tabelle 7 beschriebene wässrige Lösung als Lysepuffer verwendet.

Lysepuffer		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Tris-Puffer	30 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	5 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
NaF	30 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	3 Gew.-%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	10 Vol.-%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphataseinhibitor (PhosSTOP)	*	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor (cOmplete)	*	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 7. Zusammensetzung des Lysepuffers. *: Dosierung nach Herstellerangaben

Die Zellkulturschalen wurden aus dem Inkubator entnommen und das Kulturmedium vorsichtig, aber gründlich abgenommen. Unmittelbar im Anschluss wurden die Schalen auf Eis gestellt und je Schale 50 µl des Lysepuffers hinzugegeben und für ca. 1 Minute mit einem CellScraper verteilt sowie dadurch gleichzeitig die Zellen vom Boden abgelöst und lysiert. Das Lysat wurde danach möglichst vollständig in Eppendorf-Cups überführt. 8 µl Lysat wurden für die Proteinbestimmung in einen separaten Cup gegeben und alle Proben direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.1.8. Optimierung der Zellkulturbedingungen

Zu Beginn der Versuche mussten erst die optimalen Bedingungen für die Zellkulturen ermittelt werden. Eine feste Anhaftung der Kardiomyozyten am Boden der Zellkulturschalen ist notwendig, um nicht z.B. bei einem Mediumwechsel mit der abgenommenen Flüssigkeit verloren zu gehen. Hierfür war es notwendig die aus Polystyrol bestehenden Schalen (*cellstar 35 x 10 mm, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich*) zu beschichten. Hierfür wurde Laminin- und Gelatinelösung getestet. Von 12 Kulturschalen wurde in 6 Schalen 80 µl einer 1:10 verdünnten Lamininlösung gegeben und diese mit einem CellScraper gründlich am Boden verteilt. In die anderen Schalen wurde je 1 ml einer 0,1% Gelatinelösung (*Carl Roth, Karlsruhe*) gegeben. Beide Beschichtungen wurden zum Antrocknen über Nacht bei +4 °C gelagert. Bei der Gelatine-Lösung wurde am nächsten Tag die überstehende Flüssigkeit abgesaugt.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Isolation von zwei Wildtyp-Mäuseherzen nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die Zellen wurden, nachdem die überstehende 0,8 mM Calcium-Lösung entfernt wurde, gleichmäßig in je 3 ml Plattiermedium auf die 12 Zellkulturschalen verteilt. Dann erfolgte eine Ruhephase von 2 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 Vol.-% CO₂). Im Anschluss wurde das Plattiermedium vorsichtig abgesaugt und von dem entsprechenden Kulturmedium je 3 ml hinzugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss für 21 Stunden inkubiert (37 °C, 5 Vol.-% CO₂). Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium in den Schalen zweimal hintereinander vorsichtig gewechselt. Im Anschluss wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop

qualitativ untersucht, um die beste Beschichtung der Kulturschalen zu ermitteln (Ergebnisse siehe Kapitel 3.1.2).

2.2. Proteinbiochemische Untersuchungen

2.2.1. Bestimmung der Proteinmenge mittels BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels des BCA-Tests. Hierbei werden Proteine mit Hilfe von Bicinchoninsäure und Kupfer²⁺-Ionen nachgewiesen. (68,69) Im alkalischen Milieu bildet sich in Anwesenheit von Proteinen eine violette Komplexverbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Zur Eichung der photometrischen Messung wurde eine Referenzlösung mit 80 mg/ml humanem Serum-Albumin und γ-Globulinen (*Protein Standard 80 mg/ml, HSA and gamma-globulins, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) verwendet.

Bereits bei Lyse der Zellkulturen wurden von jeder Probe 8 µl Lysat zur Proteinbestimmung asserviert. Dieses Lysat wurden nun mit PBS (*Phosphatgepufferte Salzlösung, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) 1:10 verdünnt und in eine 96-Well-Platte gegeben (*96 Flat Bottom Transparent Polystyrol, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich*). Von jeder Probe, sowie von jeder Konzentrationsstufe der Referenzprobe wurden Triplets von je dreimal 20 µl in die 96-Well-Platte gegeben. Im Anschluss wurden in jedes Well 200 µl der BCA-Reagenz (*50:1 Mischung von Bicinchoninsäure und Kupfer(II)-Sulfat, ThermoFisher, Waltham, USA*) pipettiert. Hiernach erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten. Danach wurde die Absorption der Proben bei 540 nm mittels eines Photometers (*Infinite 200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz*) vermessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Excel (*Microsoft Excel, Version 2202, Microsoft Corporation, Redmond, USA*) aus einer über die Referenzlösung bestimmten Eichkurve.

2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung des Proteingemisches nach dem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die in der Probe enthaltenen Proteine werden durch das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) einheitlich negativ geladen. Hierdurch erfolgte eine längliche Streckung der Proteine, wodurch

erreicht wird, dass sich die Proteine im Trengel nach ihrer Molekülmasse geordnet auftrennen und nicht z.B. getrennt nach den Eigenladungen der beteiligten Aminosäuren. (69,70)

Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches Gradientengel (*Mini-Protean TGX Gels 4-15%, Bio-Rad, Hercules, USA*) verwendet. Dem Lysat wurden 20 Vol.-% Proben-Puffer (bestehend aus 90 Vol.-% Blue-Buffer (*Carl Roth, Karlsruhe*) und 10 Vol.-% β-Mercaptoethanol (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) zugesetzt. Im Anschluss erfolgte zur Denaturierung eine 30-minütige Inkubation bei 37°C unter schneller Agitation mit 650 rpm. Die Proben wurden dann mit PBS so verdünnt, dass eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl erreicht wurde. Pro Lane wurden somit 15 µg Protein aufgetragen. Als Markerlösung wurden je 2,5 µl kommerzieller Marker verwendet (*peqGOLD Protein Marker V prestained, Peqlab, Erlangen*).

Als Elektrophoresekammer wurde die *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, USA)* verwendet, welche mit Elektrophorese-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) gefüllt wurde. An die beladenen Gele wurde mittels einer regelbaren Gleichspannungsstromquelle für die ersten 10 Minuten eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Hierunter ergaben sich initial Stromstärken von ca. 55 mA. Im Anschluss wurde die Spannung auf 200 V verdoppelt (hierunter ca. 120 mA Stromstärke). Der Strom wurde abgestellt, kurz bevor die Laufmittelfront das Ende des Gels erreichte (Laufzeit bis dahin jeweils ca. 45 Minuten).

Elektrophoresepuffer		
Substanz	Menge	Hersteller
ddH ₂ O	2000 ml	
Tris-Base	6,02 g	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	28,8 g	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	2 g	Carl Roth, Karlsruhe
pH mit konz. HCl auf 8,3 einstellen		

Tabelle 8. Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers.

2.2.3. Western-Blot

Die Proteine lagen nach Durchführung der SDS-PAGE in den Gelen bereits nach ihrer Molekülmasse räumlich getrennt vor. Um die Proteine für Untersuchungen mit Antikörper zugänglich zu machen, mussten sie nun mittels Western-Blot auf Nitrocellulose-Membranen überführt werden. (69)

Hierzu wurde zuerst die Umhüllung der Gele, wie vom Hersteller empfohlen, aufgebrochen und die Gele vorsichtig in ein Bad mit Transferpuffer überführt (Zusammensetzung siehe Tabelle 9). Die Gele wurden im Anschluss jeweils auf eine passend zugeschnittene Nitrocellulose-Membran (*GE Healthcare, Chicago, USA*) gelegt und von beiden Seiten mit je 2 Lagen Filterpapier sowie mittels Schwamm fixiert. Die so vorbereiteten Kassetten wurden in die mit Transfer-Puffer gefüllten Blotting-Kammern eingespannt (*Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, Hercules, USA*). Zur Kühlung wurden die Kammern in Eiswannen gestellt. Zum Transfer wurde eine Gleichspannungsstromquelle verwendet, welche für eine Zeit von 2:20 Stunden auf eine konstante Stromstärke von 400 mA eingestellt wurde (hierunter ca. 80 V Spannung).

Transferpuffer		
Substanz	Menge	Hersteller
ddH ₂ O	1600 ml	
Tris-Base	7,88 g	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	28,8 g	Carl Roth, Karlsruhe
pH mit konz. HCl auf 8,3 einstellen		
Methanol	400 ml	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	0,2 g	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 9. Zusammensetzung des Transferpuffers.

Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Membranen aus den Kammern entnommen werden. Zum reversiblen Anfärben der Proteine wurden die Membranen vorsichtig mit Ponceau S (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) angefärbt. Nach mehreren Waschvorgängen mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) wurden so die Proteinbanden sichtbar. Hierdurch, sowie mit Hilfe des vorgefärbten Markers konnten die Membranen mit einem Skalpell in 5-6 Streifen für bis zu 6 verschiedene Proteine

zerschnitten werden (Schnittverläufe siehe Kapitel 3.1.3). Danach wurden die Membranen so lange mit TBS-T-Puffer (*Tris-buffered Saline und Tween 20, Carl Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) gespült, bis keine Ponceau-Färbung mehr sichtbar war.

2.2.3.1. Antikörperfärbungen

Nach Durchführung der bisherigen Arbeitsschritte lagen die Proteine an die Oberfläche der Nitrocellulose-Membran gebunden vor und mussten nun noch nachgewiesen werden. Aus technischen Gründen erfolgte dies mittels getrennter Primär- und Sekundärantikörper. Die Primärantikörper binden spezifisch an ein Epitop des gesuchten Proteins, können jedoch selbst nicht direkt nachgewiesen werden. Hierfür werden Sekundärantikörper verwendet, welche an die Fc-Region des Primärantikörpers binden und selbst kovalent mit einer Peroxidase gekoppelt sind. Diese kann dann mittels Chemilumineszenz direkt nachgewiesen werden. (69)

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Anhang tabellarisch aufgelistet. Für den phosphorylierten L-Typ-Calciumkanal (CaV1.2) existiert kein dedizierter Antikörper, sodass, wie auch in diversen anderen Arbeiten, der Antikörper für phospho-CaMKII aufgrund seiner Kreuzreaktivität verwendet wurde. (71,72)

Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken (10/min) mit Milchpulverlösung (*Carl Roth, Karlsruhe*) inkubiert. Nach dem Blocken wurden die in Milchpulverlösung gelösten primären Antikörper (siehe Anhang) zu den Membranen gegeben. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei +4 °C unter langsamen Schwenken (10/min).

Am nächsten Morgen wurden die überschüssigen Primärantikörper in drei Waschschritten mit TBS-T-Puffer von je 10 Minuten schneller Agitation (50 rpm) ausgewaschen. Danach wurden die ebenfalls in Milchpulverlösung gelösten Sekundärantikörper (tabellarische Auflistung im Anhang) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter langsamer Agitation (10 rpm) inkubiert. Daraufhin folgten erneut drei 10-minütige Waschschritte mit TBS-T-Puffer (50 rpm), um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen.

Im nächsten Schritt katalysiert die an die Sekundärantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Das oxidierte Luminol befindet sich anfangs in einem angeregten Zustand, von welchem es durch die Emission von Licht in den Grundzustand übergeht. Dieses Licht wird mittels Röntgenfilm nachgewiesen.

Zuerst wurden die Membranen hierfür kurz angetrocknet um daraufhin mit einer nach Herstellerangaben vorbereiteten Chemilumineszenz-Reagenz (*Immobilon Western HRP Substrat, Merck Millipore, Billerica, USA*) bedeckt zu werden. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Substrat durch Abtupfen entfernt. Nun wurden die Membranen rasch in eine Röntgenkassette eingebracht. In der Dunkelkammer wurde dann Röntgenfilm (*Super-XR, Fujifilm, Tokio, Japan*) zur Belichtung für variable Zeiten mit in die Kassette eingelegt und direkt anschließend mit Hilfe eines Entwicklungsautomaten (*M35 X-Omat, Kodak, Rochester, USA*) entwickelt. Die Belichtungszeiten wurden dabei so angepasst, dass für jedes einzelne Protein eine möglichst optimale Belichtung ohne Über- oder Unterbelichtung stattfand.

Die so entwickelten Filme wurden mittels eines kommerziellen Automaten zur Bildauswertung digitalisiert (*ChemiDoc MP Imager, Bio-Rad, Hercules, USA*). Die Auswertung der eingescannten Filme erfolgte mit Hilfe der Software *ImageJ (Version 1.51u, Wayne Rasband)*. Hierfür wurde das Werkzeug *Calibrate* verwendet, um ein Flächenintegral der optischen Dichte der Banden zu erhalten. Die Banden wurden mittels eingezeichneter Boxen manuell vollständig ausgewählt, die Helligkeit des Hintergrundes mittels manueller Korrekturlinien ausgeblendet. Die so erhaltenen Werte wurden in eine *Excel*-Tabelle übertragen.

2.2.3.2. Membranen strippe

Ein Teil der Membranen wurde zur möglichst effizienten Ausnutzung der vorhandenen Proteinmenge nach der vollständigen Auswertung des ersten Proteins von sämtlichen gebundenen Antikörpern befreit (sog. Strippen der Membran) und im Anschluss mit Antikörpern gegen ein anderes Protein mit jedoch ähnlicher Molekülmasse behandelt.

Hierzu wurden die betroffenen Membranen zuerst für 5 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen (dieser und alle folgenden Schritte bei 60 rpm), im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschritt über 4 Minuten mit ddH₂O. Danach wurden die Membranen

8 Minuten mit Natronlauge behandelt ($\text{NaOH } 0,2 \text{ mM}$, *Carl Roth, Karlsruhe*) um sämtliche Antikörper abzulösen. Als nächstes folgte erneut ein 4-minütiger Waschschritt in ddH_2O und weitere 5 Minuten mit TBS-T-Puffer. Im Anschluss wurden die Membranen erneut mit Milchpulverlösung für eine Stunde unspezifisch geblockt und alle weiteren Waschschritte wie bereits zuvor beschrieben erneut durchgeführt.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die zu Beginn der Auswertung in *Excel* vorliegenden Werte sind nicht als absolut zu verstehen, da sie sich z.B. bedingt durch unterschiedliche Belichtungszeiten unterscheiden. Um diese Werte miteinander vergleichen zu können, müssen sie also zuerst normiert werden. Hierzu verwendet man sogenannte Housekeeping-Gene, also Proteine, welche essentielle metabolische Aufgaben in der Zelle erfüllen und daher in einem bestimmten Gewebe weitestgehend konstant exprimiert werden wie im Myokard z.B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Calsequestrin (CSQ). Die Normierung der Proteine erfolgte aus den Messwerten je eines Gels nach folgender Formel:

$$\text{Proteinmenge}_{\text{normiert}} = \frac{\text{Proteinmenge}}{\text{Haushaltsgen}}$$

Die Phosphorylierungslevel in den verschiedenen Kulturen wurden wie folgt berechnet, hierfür dürfen auch normierte Messwerte von verschiedenen Gels verwendet werden:

$$\text{Phosphorylierungslevel (Protein)} = \frac{\text{Proteinmenge}_{\text{normiert}}(\text{Phosphoprotein})}{\text{Proteinmenge}_{\text{normiert}}(\text{Protein})}$$

Abschließend wurden noch für jedes Phosphoprotein die Phosphorylierungslevel der verschiedenen Mutanten auf den Mittelwert der Phosphorylierungslevel des Wildtyps normiert:

$$\begin{aligned} & \text{Phosphorylierungslevel}_{\text{normiert}}(\text{Protein/Mutante}) \\ &= \frac{\text{Phosphorylierungslevel}(\text{Protein/Mutante})}{\text{Mittelwert Phosphorylierungslevel}(\text{Protein/Wildtyp})} \end{aligned}$$

Die so berechneten Phosphorylierungslevel wurden nach der manuellen Entfernung extremer Ausreißer (Abweichung vom Mittelwert größer Faktor 10 mit visueller Bestätigung, dass ein technisches Problem beim Blot als Fehlerursache anzunehmen

ist) in das Statistikprogramm SPSS (*Version 26, International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, USA*) übertragen. In SPSS wurde anschließend eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem normierten Phosphorylierungslevel als abhängiger Variable und der Mutante als Faktor durchgeführt. Bei Vorliegen eines signifikanten Ergebnisses wurde eine post-hoc-Analyse mittels Tukey-HSD-Test durchgeführt.

2.3. Phosphatase-Aktivitäts-Assay

2.3.1. Vorbereitung der Proben

Die Proben für den Phosphatase-Aktivitäts-Assay lagen als bei -80 °C gefrorene, pulverisierte Herzen vor. Diese Proben wurden in Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde den Proben jeweils 200 µl Homogenat-Puffer zugegeben (Zusammensetzung siehe Tabelle 10). Im Anschluss wurden die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dabei in kurzen Abständen mit dem Vortexmixer gründlich durchmischt. Danach wurden die Proben 5 Minuten lang bei +4°C mit 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen. Von diesem Überstand wurden 8 µl für die Proteinbestimmung mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.1) in einen separaten Cup gegeben und alle Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Homogenat-Puffer		
Substanz	Konzentration	Hersteller
Tris-Puffer	50 mmol/l	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	150 mmol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	2 Vol.-%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS	0,1 Gew.-%	Carl Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitor (cOmplete)	*	Roche, Basel, Schweiz

Tabelle 10. Zusammensetzung des Homogenat-Puffers. *: Dosierung nach Herstellerangaben

2.3.2. Vorbereitung Phosphatase-Hemmstoffe

Um die Aktivität der PP-1 messen zu können, ohne dass andere Phosphatasen mit der Messung interferieren, wurden zwei verschiedene Phosphatase-Hemmstoffe mit gegensätzlichen Spezifitäten für PP1 versus PP2a verwendet:

- Okadasäure hemmt bereits in niedrigen Konzentrationen von 2 nM die Protein-Phosphatase 2a (PP-2a), in höheren Konzentrationen von 10 nM zusätzlich die PP-1. (73,74)
- Tautomycin inhibiert in niedrigen Konzentrationen von 3 nM bereits vollständig die PP-1, während die PP-2a erst bei deutlich höheren Konzentrationen gehemmt wird. (75)

Die Phosphatase-Assays wurden je mit mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen der Hemmstoffe durchgeführt um aus der Differenz der Messerwerte isoliert die Aktivität der PP-1 berechnen zu können.

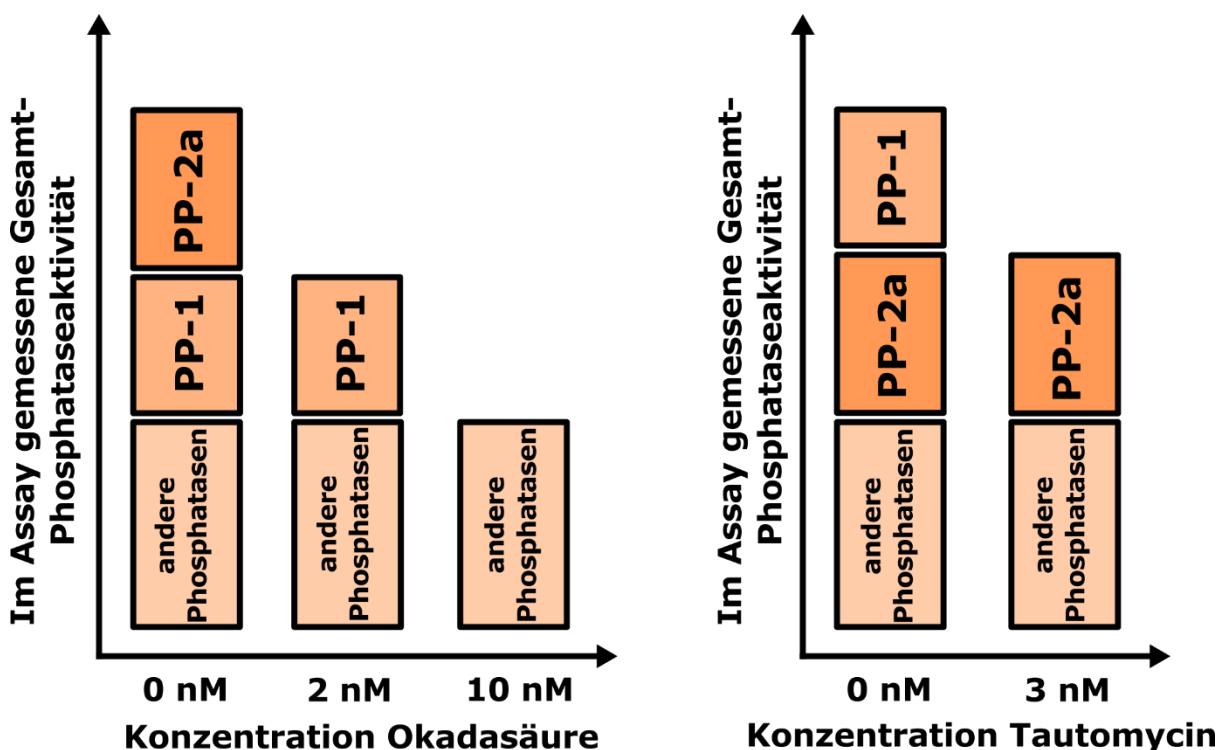


Abbildung 7. Hemmung verschiedener Phosphatasen durch Okadasäure und Tautomycin.

Die wasserunlösliche Okadasäure (*ChemCruz, Dallas, USA*) lag bei Lieferung als Feststoff vor und wurde in Dimethylsulfoxid (*DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) gelöst, sodass eine Stammlösung mit einer Stoffmengenkonzentration von 50 nM vorlag. Diese wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zudem wurde wie oben ausgeführt Tautomycin (*Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA*) verwendet. Dies lag bei Lieferung ebenfalls als Feststoff vor und wurde in DMSO gelöst. Diese Lösung wurde dann mit ddH₂O weiter verdünnt, sodass eine Stammlösung mit einer Stoffmengenkonzentration von 1,5 µM vorlag. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.3.3. Durchführung Phosphatase-Aktivitäts-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der Protein-Phosphatase-1 wurde ein kommerzieller Assay verwendet (*EnzChek Phosphatase Assay Kit, Molecular Probes / Thermo Fisher, Waltham, USA*). Dieser verwendet als Substrat 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphate (DiFMUP). Befinden sich Phosphatasen in der Probe, so wird durch diese die Abspaltung der Phosphatgruppe des Substrates katalysiert und es entsteht ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt mit einem Anregungs- bzw. Emissionsmaximum von 358 bzw. 455 nm.

Der Assay wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt (*96 Flat Bottom Transparent Polystyrol, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich*). Der Reaktionspuffer wurde gemäß Herstellerangaben vorbereitet und davon 50 µl in jedes verwendete Well der Platte vorgelegt. Im Anschluss wurde in die dafür jeweils vorgesehenen Wells die vorbereitete Okadasäure zugegeben, danach erfolgte die Zugabe der Proben-Homogenate (25 µg Protein pro Well). Diese wurden so verdünnt, dass ein Gesamtvolumen von 100 µl pro Well vorlag. Die Wells ohne Zugabe von Okadasäure wurden als Leerwerte genutzt. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurden diese daher doppelt aufgetragen. Um einen möglichst zeitgleichen Reaktionsstart bei dennoch gründlicher Durchmischung der Flüssigkeiten zu erzielen, wurde bei diesen Arbeitsschritten, sofern sinnvoll möglich, immer mit einer 8-fach Pipette gearbeitet. Die 96-Well-Platte wurde im Anschluss in das Gerät zur Fluoreszenzmessung eingelegt.

Hierfür wurde das Plattenlesegerät Infinite 200 Pro (*Tecan, Männedorf, Schweiz*) verwendet. Die Proben wurden bei 37 °C inkubiert. Die Anregung für die Fluoreszenzmessung erfolgte mit einer Exzitationswellenlänge mit einem Maximum bei 358 nm (Bandbreite 9 nm). Die Messung der Emission erfolgte bei 452 nm (Bandbreite 20 nm). Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurden in jedem Well an vier verschiedenen Stellen Messungen durchgeführt und der Mittelwert aus den

Einzelmessungen gebildet. Die Verstärkung des Gerätes wurde während der Versuchsdauer auf einen konstanten Wert (60) eingestellt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgte 10, 20 und 30 Minuten nach Beginn der Reaktion.

Die Messergebnisse wurden vom Plattenlesegerät in einer Tabelle gespeichert und im Anschluss manuell in eine Excel-Tabelle (*Microsoft Excel, Version 2202, Microsoft Corporation, Redmond, USA*) überführt.

Eine zunehmende Phosphatase-Aktivität im Assay resultiert in einer vermehrten Bildung des fluoreszierenden Reaktionsproduktes. Daher ist die insgesamt gemessene Fluoreszenz proportional zur gesamten Phosphataseaktivität im jeweiligen Probenansatz. Um hierbei isoliert die Aktivität der PP-1 betrachten zu können kamen die beiden oben beschriebenen Hemmstoffe der PP-1 zum Einsatz: Okadasäure und Tautomycin.

Okadasäure hemmt bereits in niedriger Konzentration die Aktivität der PP-2a. Eine Hemmung der PP-1 findet erst bei höheren Konzentrationen statt. (73,74) Daher lässt sich mit folgender Formel aus der Differenz der Fluoreszenzen bei Zugabe von 2 nM und 10 nM Okadasäure die Aktivität der PP-1 berechnen:

$$\text{Aktivität PP - 1} = \frac{\text{Fluoreszenz (2 nM OA)} - \text{Fluoreszenz (10 nM OA)}}{\text{Fluoreszenz (0 nM OA)}}$$

Tautomycin hemmt die Aktivität der PP-1 spezifisch und vollständig bei einer Konzentration von 3 nM, eine Hemmung der PP-2a findet erst bei Konzentrationen von 30 nM statt. (75) Daher entspricht die Aktivität der PP-1 der Differenz der Fluoreszenzen bei Zugabe von 0 nM und 3 nM Tautomycin:

$$\text{Aktivität PP - 1} = 1 - \frac{\text{Fluoreszenz (3 nM Tautomycin)}}{\text{Fluoreszenz (0 nM Tautomycin)}}$$

Eine Normierung der Fluoreszenzen erfolgte jeweils auf den Mittelwert der Wildtypen. Die so erhaltenen Fluoreszenz-Werte wurden manuell in das Statistikprogramm SPSS (*Version 26, International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, USA*) übertragen. Dort wurde zum Test auf einen möglichen Unterschied zwischen den Gruppen ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Variablen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Isolation, Kultivierung und Proteinnutzung

Bevor die für die Fragestellung zentralen Versuche durchgeführt werden konnten, mussten zuerst die Bedingungen für die Isolation und Kultivierung der murinen Kardiomyozyten sowie die optimale Nutzung des Probenmaterials für die nachfolgenden proteinbiochemischen Verfahren optimiert werden.

3.1.1. Optimierung der Isolationsbedingungen

Zur Optimierung der Ausbeute an Kardiomyozyten nach Verdau der Herzen in der Langendorff-Anlage wurden verschiedene Verdauzeiten ausgetestet. Bei einer Perfusionszeit von 8,5 Minuten, davon 4 Minuten mit enzymhaltiger Lösung, wurde die größtmögliche Ausbeute an qualitativ hochwertigen Zellen erhalten.

Eine weitere Verbesserung des Verdaus konnte durch die Gabe von Heparin erreicht werden. Mit einer Dosierung von 200 IE Heparin, welche unmittelbar nach Präparation des Herzens in den linken Ventrikel injiziert wurden, konnte die Größe des Zellpellets deutlich gesteigert werden. Es zeigte sich im Vergleich zu den Kulturen vor Heparingabe beinahe eine Verdopplung der nutzbaren Zellzahl.

Alle Herzen wurden vor Beginn des Verdaus gewogen. Für die Hälfte der Mäuse wurde zusätzlich das Körpergewicht ermittelt. Es zeigte sich ein mittleres Herzgewicht von 180 mg, passend zu den Angaben in der Literatur. (76) Das mittlere Körpergewicht der untersuchten Tiere betrug 28,1 g. Somit ergab sich bei den Tieren mit vollständigem Datensatz ein Herzgewicht zu Körpergewicht Verhältnis von 6,7 mg / g.

3.1.2. Optimierung der Kulturbedingungen

Zur Auswahl der optimalen Beschichtungen der Zellkulturschalen sowie der optimalen Kulturmedien erfolgte die Auswertung nach morphologischen sowie semiquantitativen Aspekten mittels Lichtmikroskop.

Bezüglich der Beschichtung zeigte sich ein eindeutiger Vorteil von Laminin gegenüber Gelatine. So hafteten in den Gelatine-beschichteten Schalen weitaus weniger Zellen an, als in den Laminin-beschichteten Schalen. Dies war bereits mit dem

Lichtmikroskop so eindeutig erkennbar, dass auf eine nähere quantitative Auswertung verzichtet wurde. Daher wurde in allen folgenden Versuchen Laminin zur Beschichtung der Kulturschalen verwendet.

Zur Optimierung des Kulturmediums wurden die in Tabelle 11 aufgeführten, insgesamt sechs unterschiedlich zusammengesetzten Medien getestet.

Medium Nr.	1	2	3	4	5	6
MEM+Hanks	96	96	98	98	-	-
M199	-	-	-	-	96,25	98,25
BDM	2	2	-	-	2	-
Ca²⁺ 0,1M	0,05	-	0,05	-	-	-
Glutamin	2	2	2	2	1,75	1,75
Pen/Strep	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 11. Zusammensetzung der untersuchten Kulturmedien. Zahlenwerte jeweils in Volumen-%.

Zum Plattieren wurden während der Optimierung der Kulturbedingungen zwei verschiedene Medien, jeweils mit Zusatz von fötalem Kälberserum zur sicheren Inaktivierung der Verdauungsenzyme, verwendet. Für die Medien basierend auf MEM + Hanks: 91% MEM+Hanks, 2% BDM, 5% FCS, 2% Glutamin, 0,1% Pen/Strep. Für die Medien basierend auf M199: 91,25% M199, 2% BDM, 5% FCS, 1,75% Glutamin, 0,1% Pen/Strep.

In den Kulturmedien mit Calcium-Zugabe zeigten deutlich mehr Zellen spontane Kontraktionen (d.h. zelluläre Arrhythmien), als in den Calcium-freien Medien. Zudem zeigten sich optisch in den Calcium-haltigen Medien ein deutlich größerer Anteil avitaller Zellen. Bei den Kulturmedien auf Basis von M199 zeigte sich im Vergleich zur Basis MEM + Hanks insgesamt mehr abgestorbene Zellen. Zusätzlich imponierten die Zellen in MEM + Hanks morphologisch intakter, insbesondere zeigten sich weniger verplumpte Kardiomyozyten. Somit wurde ein auf MEM + Hanks basierendes, calciumfreies Medium als Grundlage für die weiteren Versuche gewählt.

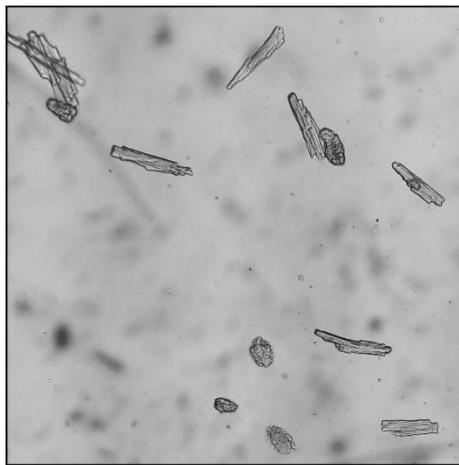
MEM Hanks + Laminin



M199 + Laminin



MEM Hanks + Gelatine



M199 + Gelatine

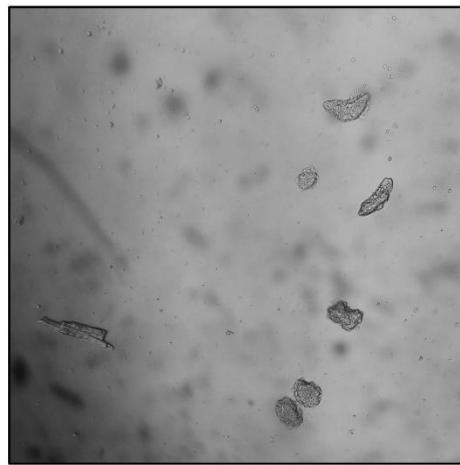


Abbildung 8. Vergleich verschiedener Zellkulturmedien (MEM Hanks und M199) sowie verschiedener Beschichtungen (Laminin und Gelatine) unter dem Lichtmikroskop.

Um eine gleichmäßige adenoviral-induzierte Expression von Inhibitor-1 über alle Kulturen hinweg zu erzielen, musste ein gleichbleibendes Verhältnis von Virusmenge zu Zellzahl gewährleistet werden. Um die Virusmenge der bei jeder Isolation schwankenden Anzahl an Kardiomyozyten anpassen zu können, muss also die Anzahl an Kardiomyozyten pro Kulturschale bekannt sein. Die Gesamtzahl der Kardiomyozyten wurde mittels Zählung einer definierten Teilmenge (1 Tropfen zu 5 µl) per Mikroskop ermittelt.

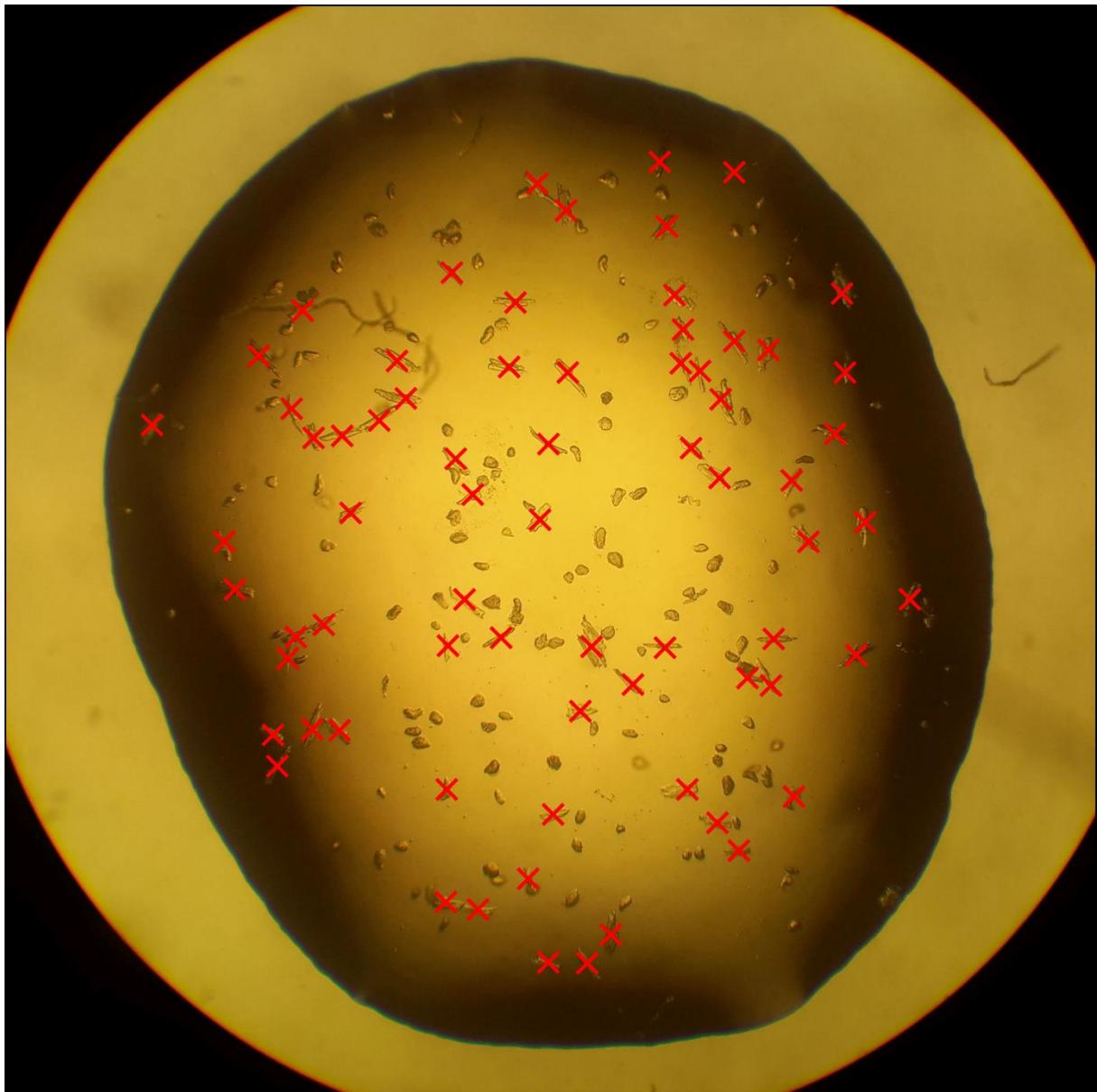


Abbildung 9. Beispiel der manuellen Auszählung (eines definierten Bruchteils) der Zellzahl pro Kulturschale. Alle in dieser Abbildung mit einem Kreuz markierten Kardiomyozyten (hier beispielhaft 71) wurden als vital gewertet. Entsprechend wurde die zugegebene Virusmenge angepasst, um ein gleichbleibendes Expressionsniveau von Inhibitor-1 zu erzielen.

Die Ergebnisse der manuellen Zählung zeigten erfreulicherweise eine relativ geringe Schwankungsbreite. So zeigten sich bei den drei Zählungen pro Isolation bzw. Kulturansatz meist drei relativ nahe beieinander liegende Werte. Im Mittel wurden pro Gesichtsfeld 79,7 Zellen gezählt. Die Standardabweichungen schwankten dabei je nach Kulturansatz zwischen 1,4 und 20,0.

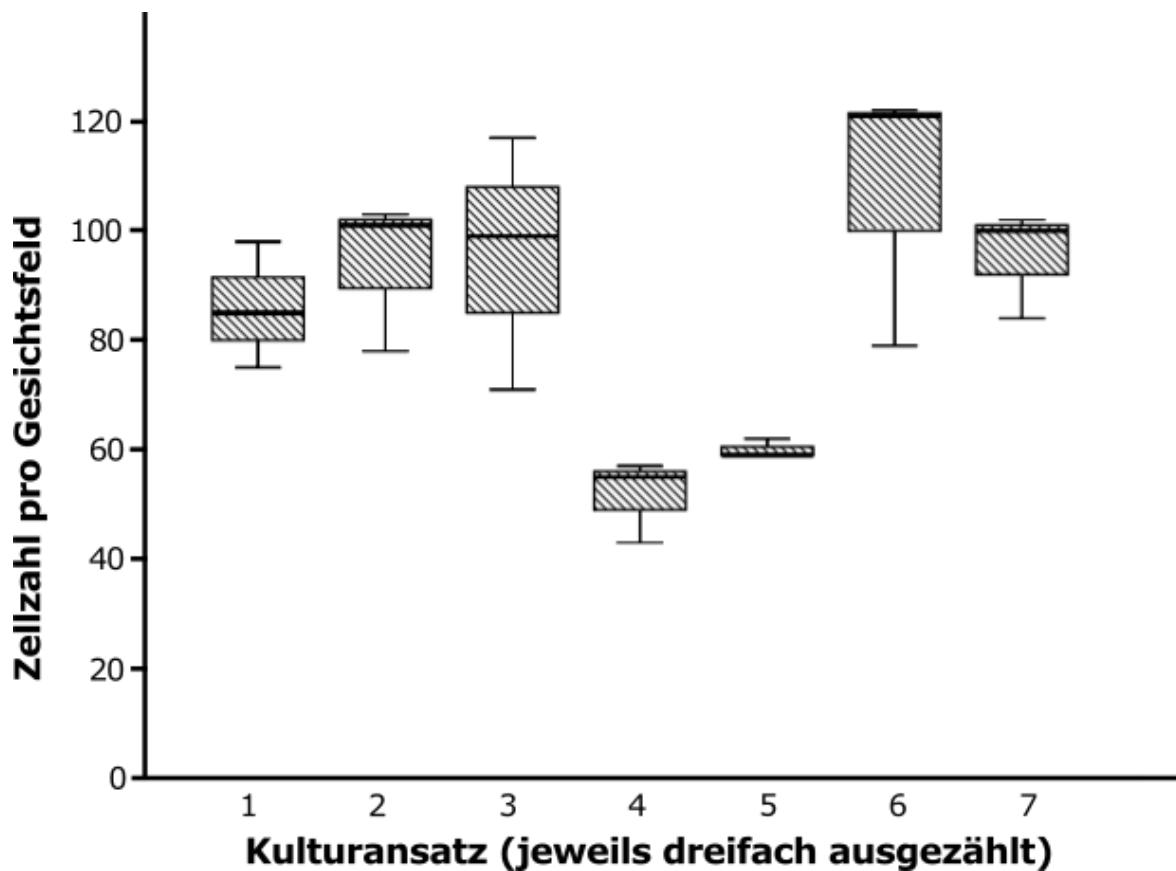


Abbildung 10. Schwankungsbreite der manuellen Auszählung. Pro Kulturansatz wurden drei Stichproben entnommen und die Zellzahl unter dem Mikroskop ermittelt.

3.1.3. Optimierung der Proteinnutzung

Da sich aus den Zellkulturen nur vergleichsweise kleine Mengen an Protein ergeben, mussten die Bedingungen für die Untersuchungen mittels Western-Blot in dem Sinne optimiert werden, dass diese Proteinmenge so effizient wie möglich genutzt werden konnte.

Anfangs wurden für die Proteinauf trennung mittels SDS-PAGE selbst gegossene Gele mit 5% Polyacrylamid-Sammelgel und 11% Polyacrylamid-Trenngel getestet. Aus den nach Western-Blotting hieraus erhaltenen Membranen konnten durch Zuschneiden pro Membran 3 verschiedene Proteine ausgewertet werden. Durch Verwendung eines kommerziell erhältliches Gradienten-Gels mit einem Polyacrylamid-Trenngel mit einer stetigen Änderung der Konzentration von 4% bis hin zu 15% („Gradienten-Gel“) konnten jedoch pro Membran 6 verschiedene Proteine analysiert werden, wie in Abbildung 11 illustriert.

Hierbei konnte Phospholemman (PLM) bei ca. 14 kDa, Phospholamban (PLB) bei ca. 24 kDa, Inhibitor-1 (I-1) bei ca. 35 kDa, CaMKII bei ca. 52 kDa, der L-Typ Calciumkanal (CaV1.2) bei ca. 240 kDa und der Ryanodinrezeptor (RyR2) bei ca. 560 kDa dargestellt werden.

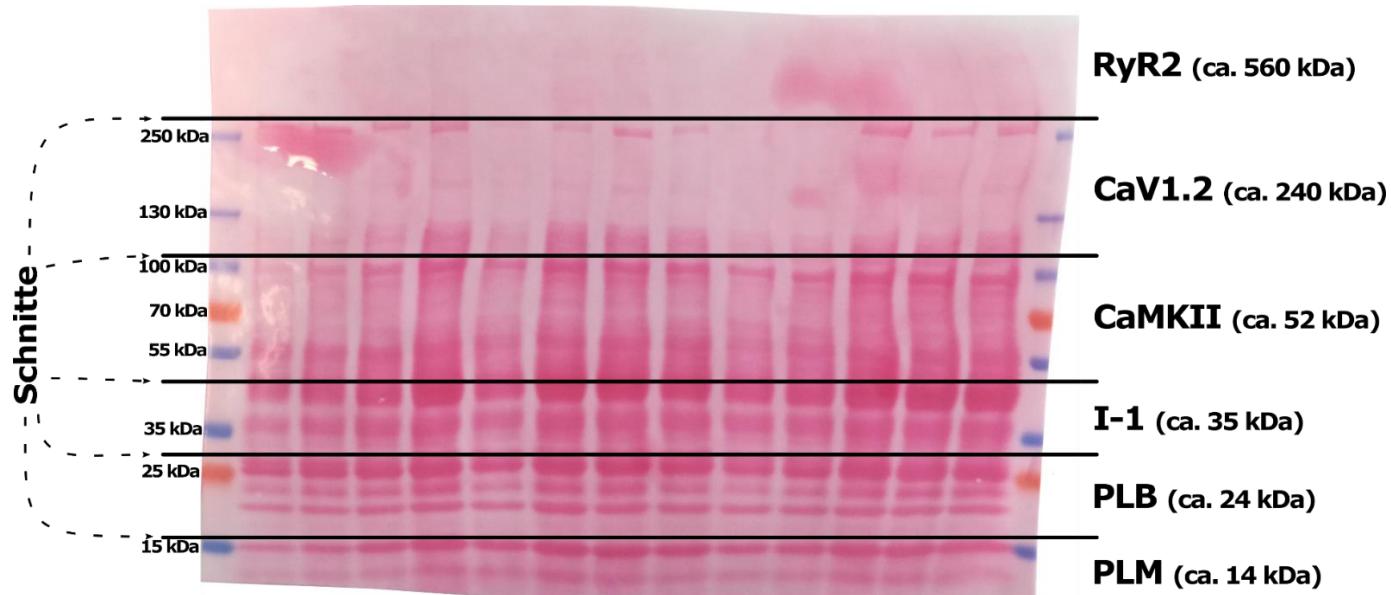


Abbildung 11. Zuschnitt der Membranen, sodass 6 verschiedene Proteine analysiert werden können. Links und rechts Markierung durch Größenmarker. Proteinfärbung mit Ponceau S. Beobachtete Positionen der Proteine in Kilotonnen.

Die Nutzung dieser Gradienten-Gele ermöglichte somit die Untersuchung möglichst vieler verschiedener Ziel-Proteine aus der nach den Zellkulturen zur Verfügung stehenden, limitierten Probenmenge.

3.2. Evaluation der Virusmengen für die Transfizierung

3.2.1. Einstellung der Virusmenge für Wildtyp-I-1

Die adenoviral induzierte Expression des mutierten bzw. Wildtyp-I-1 erfolgte in kultivierten Kardiomyozyten aus Mäusen mit Knockout von I-1, um eine „Überlagerung“ durch das sonst vorhandene endogene I-1 zu vermeiden.

Zu Beginn der Arbeit war unbekannt, wie viel Virus-Arbeitslösung zur Zellkultur einer bestimmten Anzahl lebender Kardiomyozyten zugegeben werden musste, um die Expression eines bestimmten Levels an I-1 zu erreichen (Ziel war eine 3-fach so hohe Expression von I-1 wie in Wildtyp-Mäusen). Daher wurden Zellkulturen aus I-1-Knockout-Mäusen mit aufsteigender Menge an Wildtyp-I-1-Virus inkubiert und die so adenoviral induzierten Expressionslevel von I-1 mittels Western-Blot bestimmt. Diese wurden dann mit dem Expressionsniveau von I-1 in Zellkulturen aus Wildtyp-Mäusen verglichen.

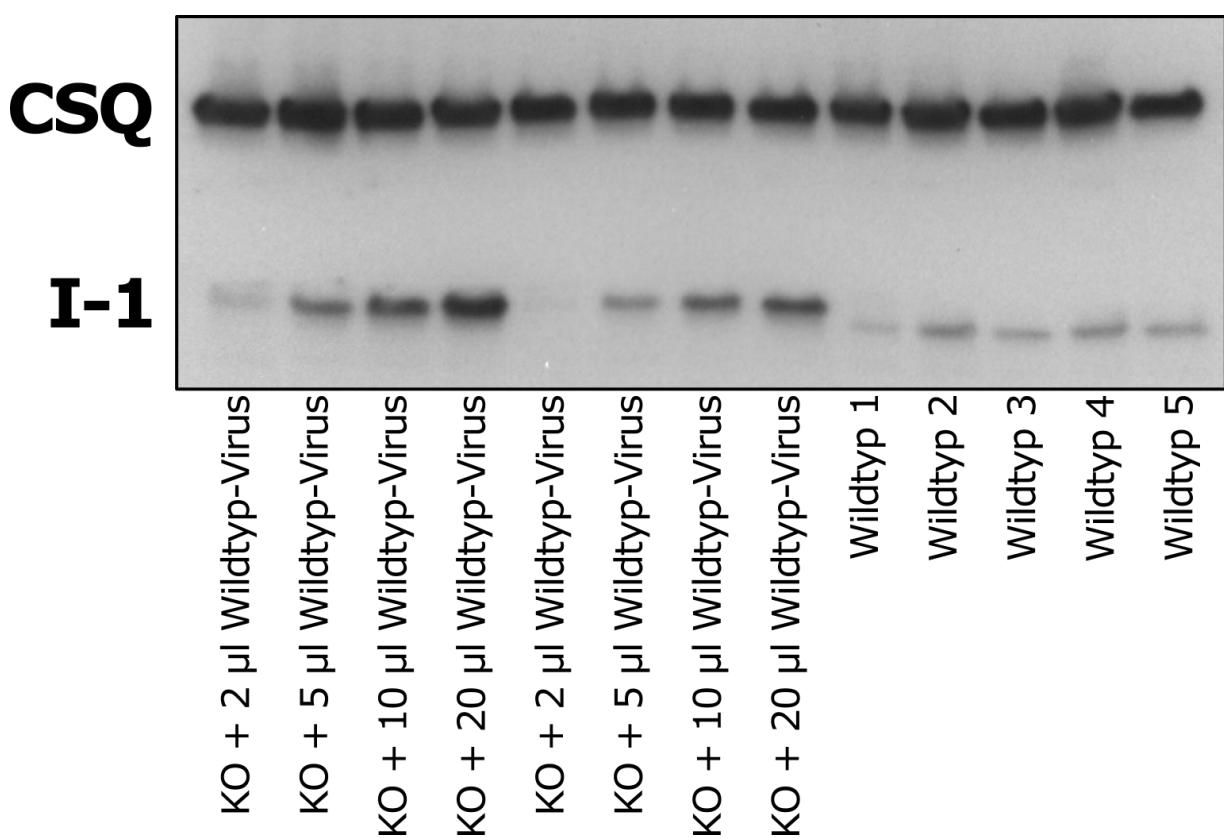


Abbildung 12. Western-Blot von Wildtyp-Mäusen (rechts) im Vergleich zu Knockout-Mäusen (KO) mit aufsteigender Viruskonzentration (links).

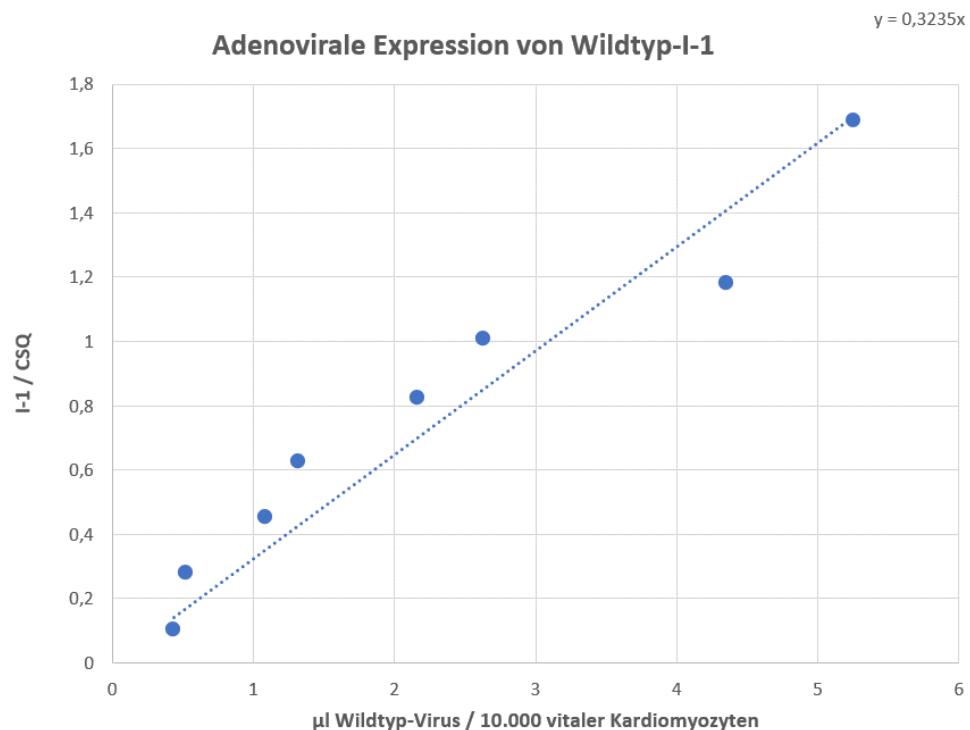


Abbildung 13. Berechnung der Eichgeraden in Microsoft Excel.

Hier zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen Virusmenge und Expressionsniveau von I-1. Mit Hilfe des Mittelwertes der Wildtyp-Kulturen konnte berechnet werden, dass zur 3-fachen adenoviralen Überexpression von I-1 im Vergleich zum Wildtyp ein Volumen von 3,42 μl Virus-Arbeitslösung des Wildtyp-Virus nötig ist.

3.2.2. Einstellung der Virusmenge für die I-1-Mutanten

Auch für die verschiedenen I-1-Mutanten musste eine Bestimmung der jeweils für das gleiche Expressionslevel benötigten Virusmengen durchgeführt werden. Hierzu erfolgte analog zu o.g. Vorgehen die Transfizierung von I-1-Knockout Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Mengen der jeweiligen Mutanten.



Abbildung 14. Exemplarisch der Western-Blot einer I1-KO-Kultur mit der $\frac{1}{3}$ -, 1- und 3-fachen Menge der als notwendig berechneten Menge Thr-47-Virus im Vergleich zur Wildtyp-Expression.

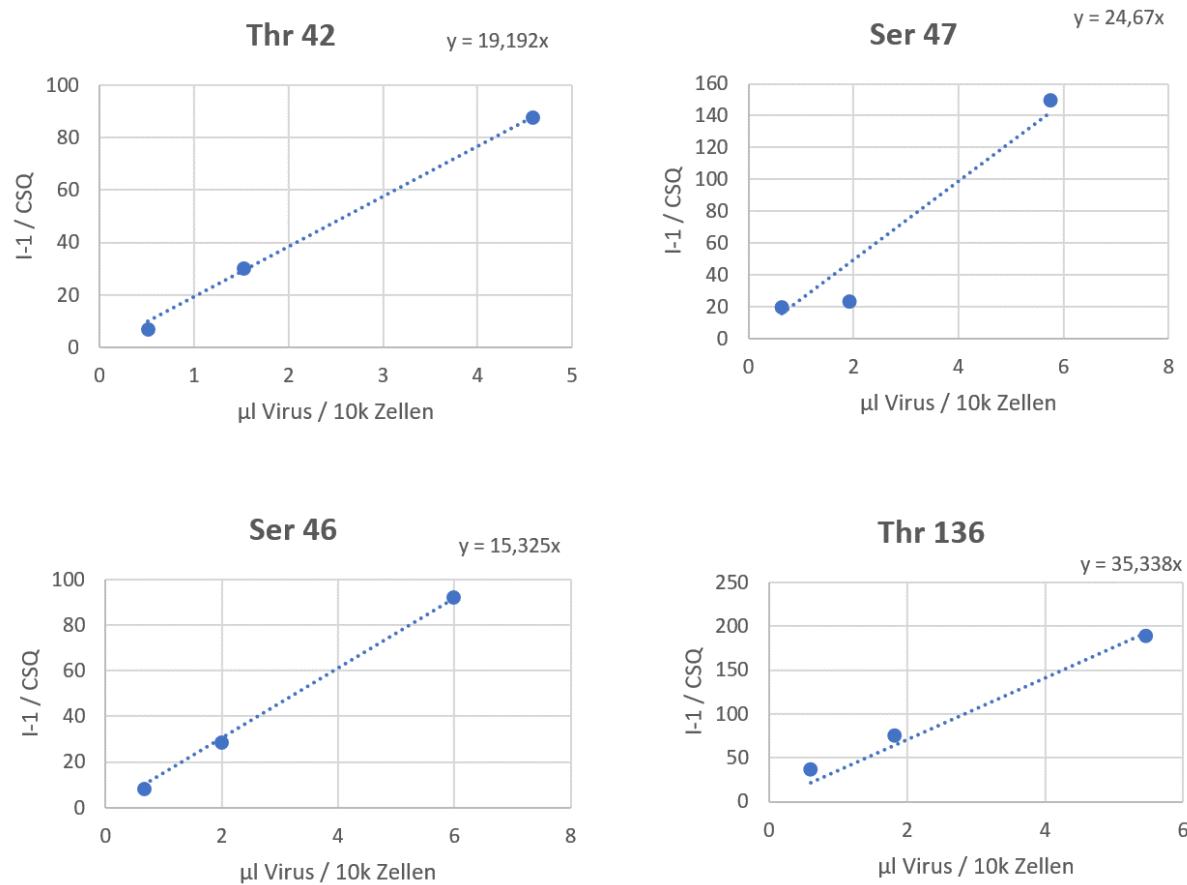


Abbildung 15. Mit Microsoft Excel ermittelte Eichgeraden.

Aus den in Abbildung 15 gezeigten Eichgeraden konnten die in Tabelle 12 aufgelisteten Volumina Virus-Arbeitslösung pro 10.000 vitaler Kardiomyozyten berechnet werden, damit eine 3-fache Überexpression im Vergleich zum Wildtyp vorliegt:

Wildtyp	Thr-42	Ser-46	Ser-47	Thr-136
3,42 μl	2,09 μl	2,65 μl	1,86 μl	0,71 μl

Tabelle 12. Experimentell bestimmte Mengen der jeweils notwendigen Viruslösung zur 3-fachen Überexpression im Vergleich zum Wildtyp.

3.3. Einfluss der phosphomimetischen I-1 Mutationen auf die Phosphorylierung von PP1-Zielproteinen (Western-Blot)

Um einen möglichen Einfluss der phosphomimetischen I-1-Mutationen auf den Phosphorylierungsstatus von bekannt bzw. spekulativ über I-1 beeinflussten Zielproteinen der PP-1 zu untersuchen, wurden diese mittels Western-Blotting untersucht. Eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine hätte eine (ggfs. lokale) Änderung der PP-1-Aktivität und damit eine Relevanz der jeweiligen I-1-Mutation für die Regulierung dieser Phosphatase nahegelegt.

3.3.1. Einfluss der T42D-Mutation von Inhibitor-1

Der Phosphorylierungsstatus des Ryanodinrezeptors an Stelle Ser-2808 (PKA-Phosphorylierungsstelle) wurde durch die adenovirale Expression des phosphomimetisch T42D mutierten I-1 (im Vergleich zur adenoviralen Expression von unmutiertem Wildtyp-I-1) nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 16).

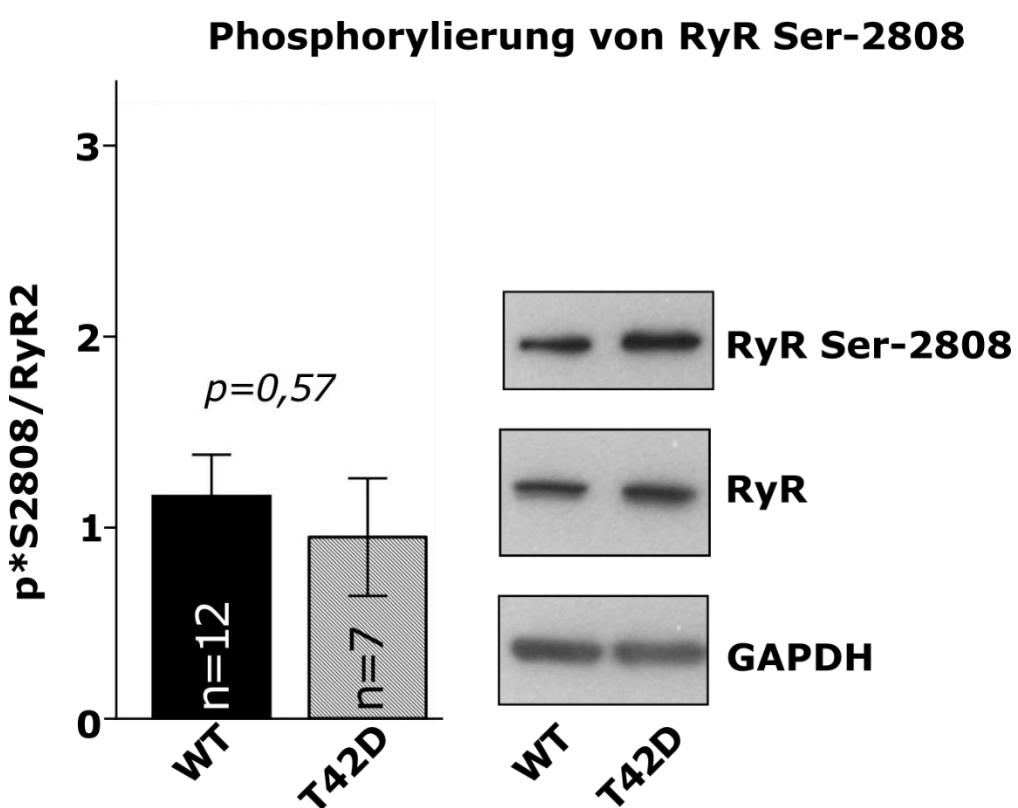


Abbildung 16. Einfluss der T42D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2808.

Auch auf die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors an der CaMKII-spezifischen Ser-2814 Phosphorylierungsstelle hat die T42D-Mutation des I-1 eindeutig keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 17).

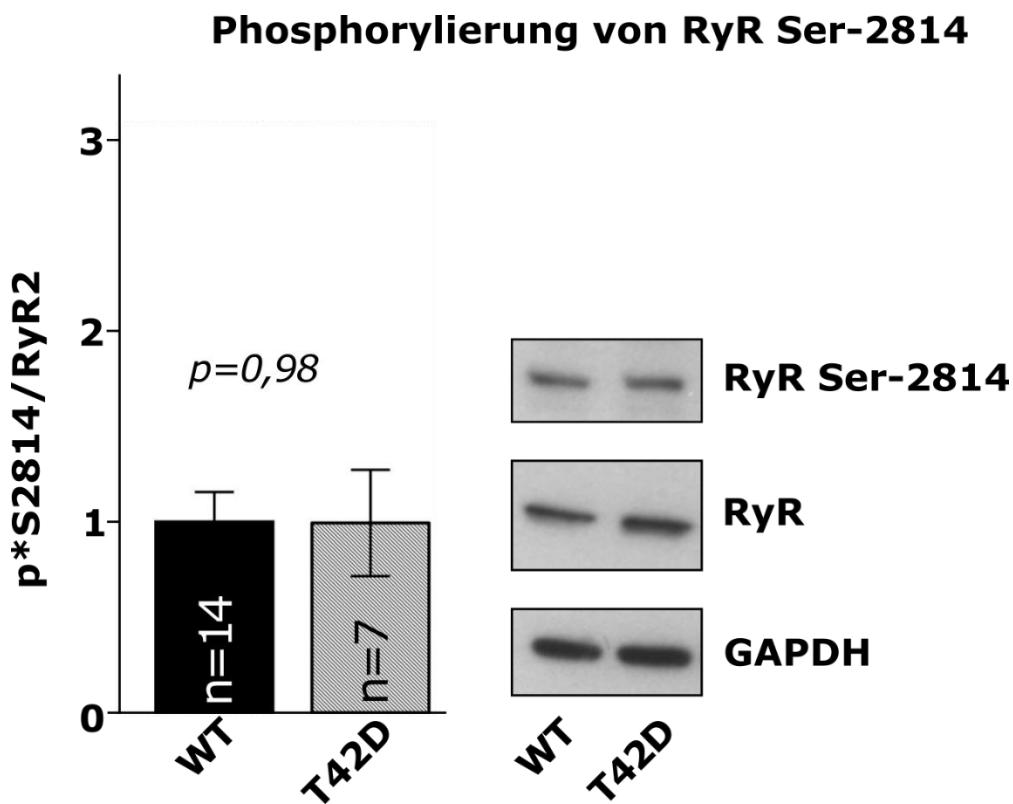


Abbildung 17. Einfluss der T42D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2814.

Ebenso wird die Auto-Phosphorylierung der CaMKII an Thr-286 (als Readout für die Aktivierung der CaMKII) durch die Expression von phosphomimetisch aktivem T42D-Inhibitor-1 nicht beeinflusst (Abbildung 18).

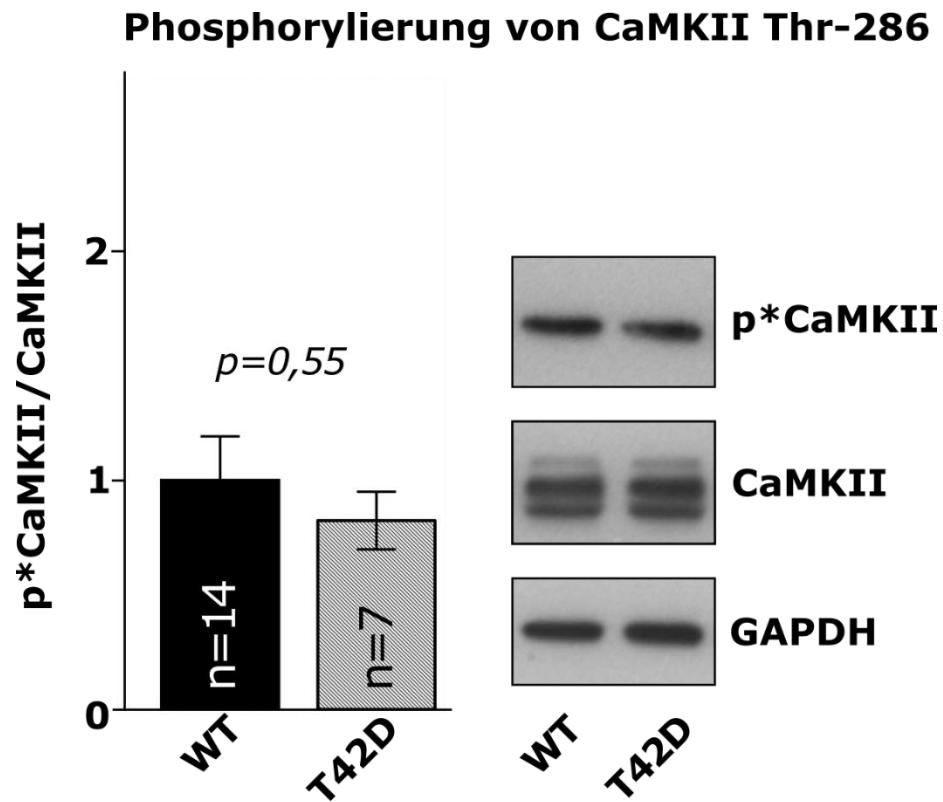


Abbildung 18. Einfluss der T42D-Mutation auf die Autophosphorylierung der CaMKII.

Auch auf die Phosphorylierung des CaV1.2 an Stelle Thr-498 lässt sich durch die Expression von T42D-Inhibitor-1 im Vergleich zu Wildtyp Inhibitor-1 kein Effekt feststellen (Abbildung 19).

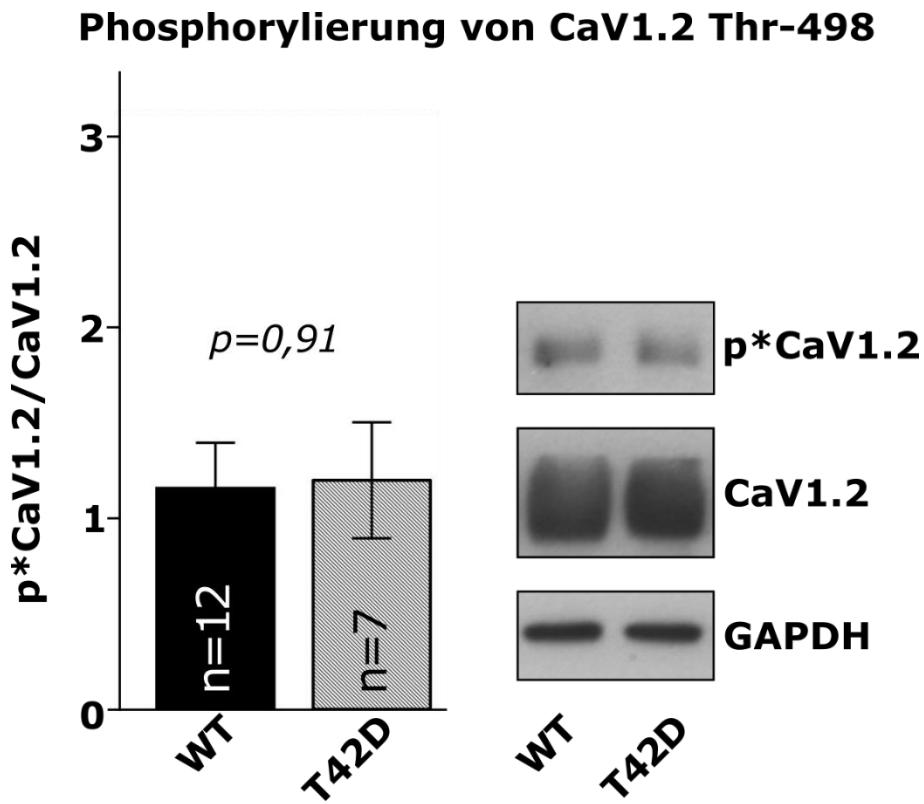


Abbildung 19. Einfluss der T42D-Mutation auf die Phosphorylierung von CaV1.2.

Die Phosphorylierung von PLB zeigt weder an der PKA-Stelle Ser-16 noch an der CaMKII-spezifischen Stelle Thr-17 einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp Inhibitor-1 und der Mutation T42D (siehe Abbildungen 20 (Ser-16) und 21 (Thr-17)).

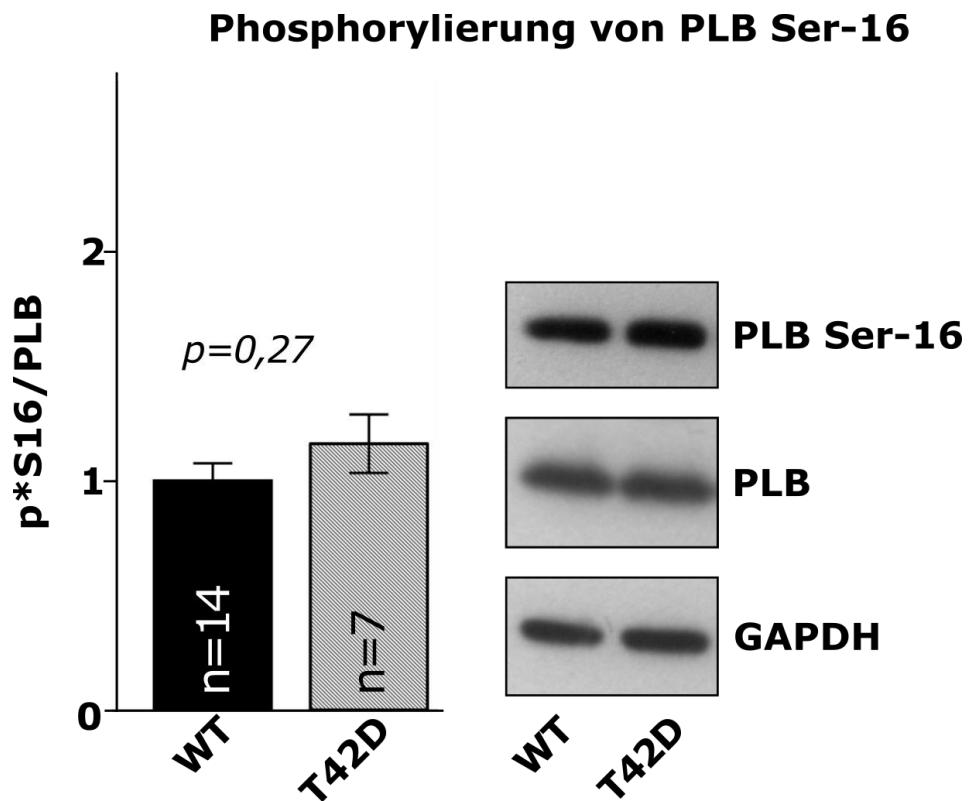


Abbildung 20. Einfluss der T42D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Ser-16.

Phosphorylierung von PLB Thr-17

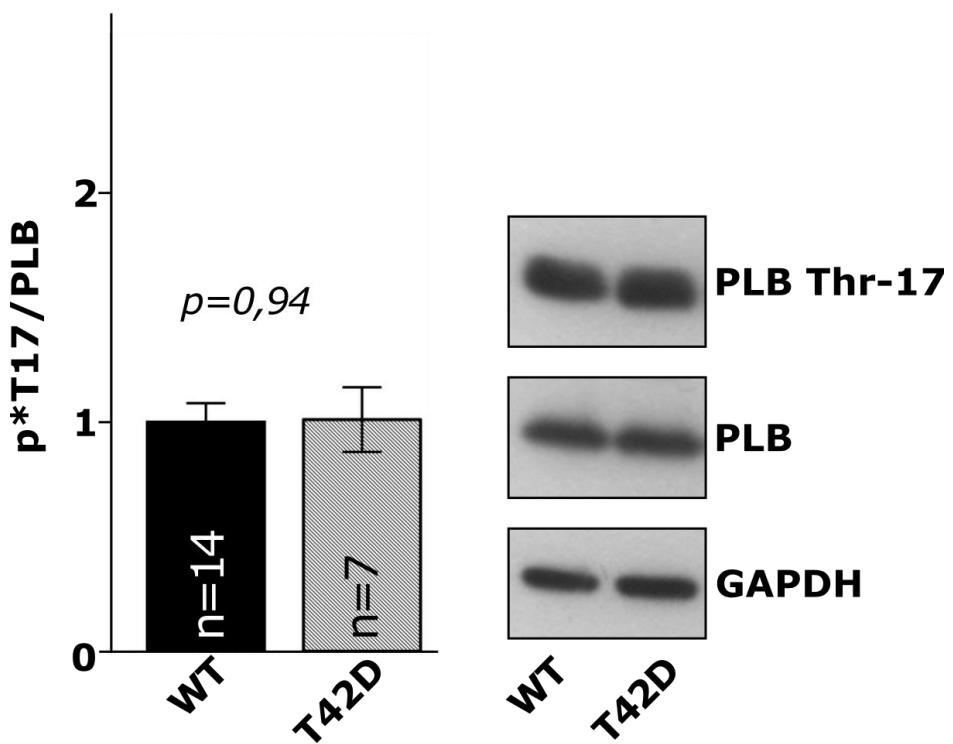


Abbildung 21. Einfluss der T42D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Thr-17.

Zusammenfassend lässt sich somit anhand dieser Ergebnisse kein Einfluss von T42D-Inhibitor-1 auf die Phosphorylierung der untersuchten PP-1-Zielproteine nachweisen, insbesondere auch nicht auf die im Allgemeinen als guter Indikator für die CaMKII-Aktivität angesehene Phosphorylierung von PLB an Thr-17.

3.3.2. Einfluss der S46D-Mutation von Inhibitor-1

Auch für die Expression der S46D-Mutation von I-1 zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt auf die PKA-spezifischen Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors an Ser-2808 (Abbildung 22).

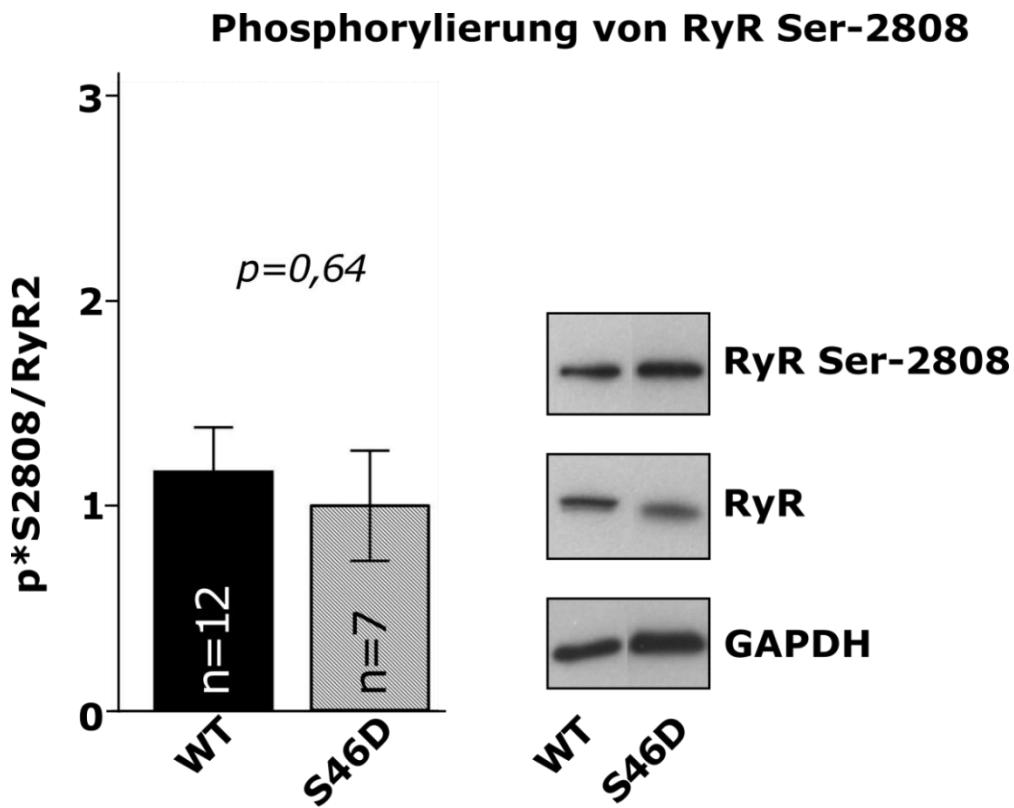


Abbildung 22. Einfluss der S46D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2808.

Ebenso war an der CaMKII-Stelle Ser-2814 kein statistisch signifikanter Unterschied des Phosphorylierungsniveaus zwischen Wildtyp I-1 und der Mutation S46D detektierbar (Abbildung 23).

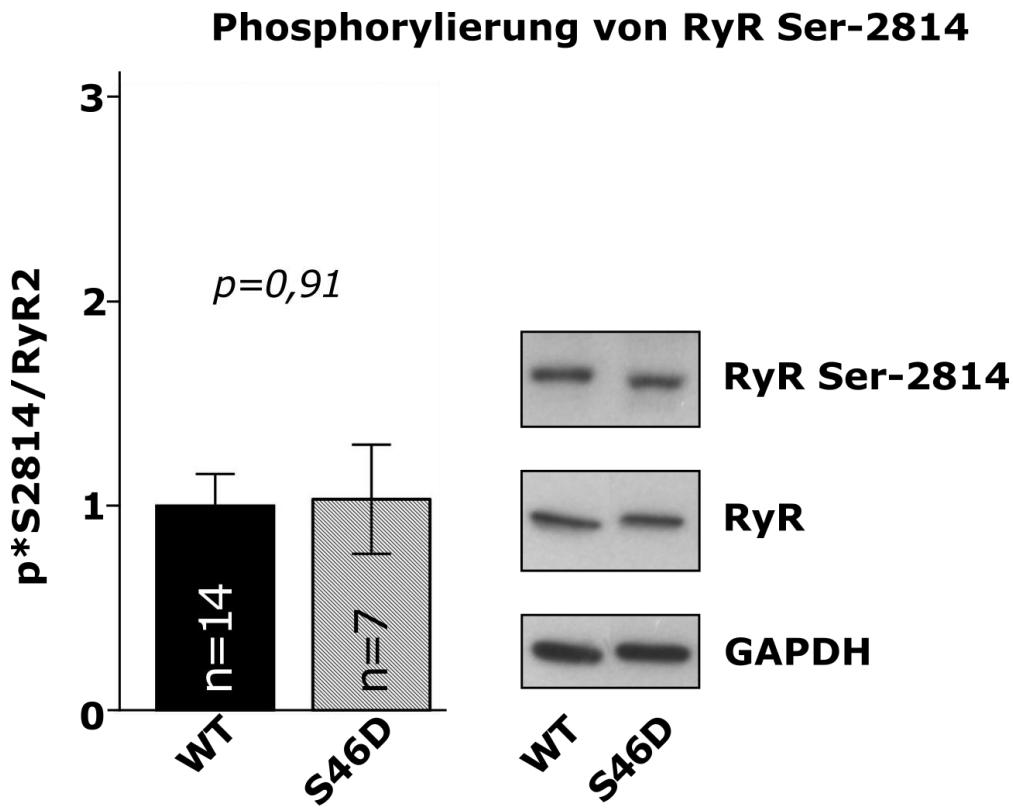


Abbildung 23. Einfluss der S46D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2814.

Die Auto-Phosphorylierung (Aktivierung) der CaMKII ist durch die Expression von I-1-S46D im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 24).

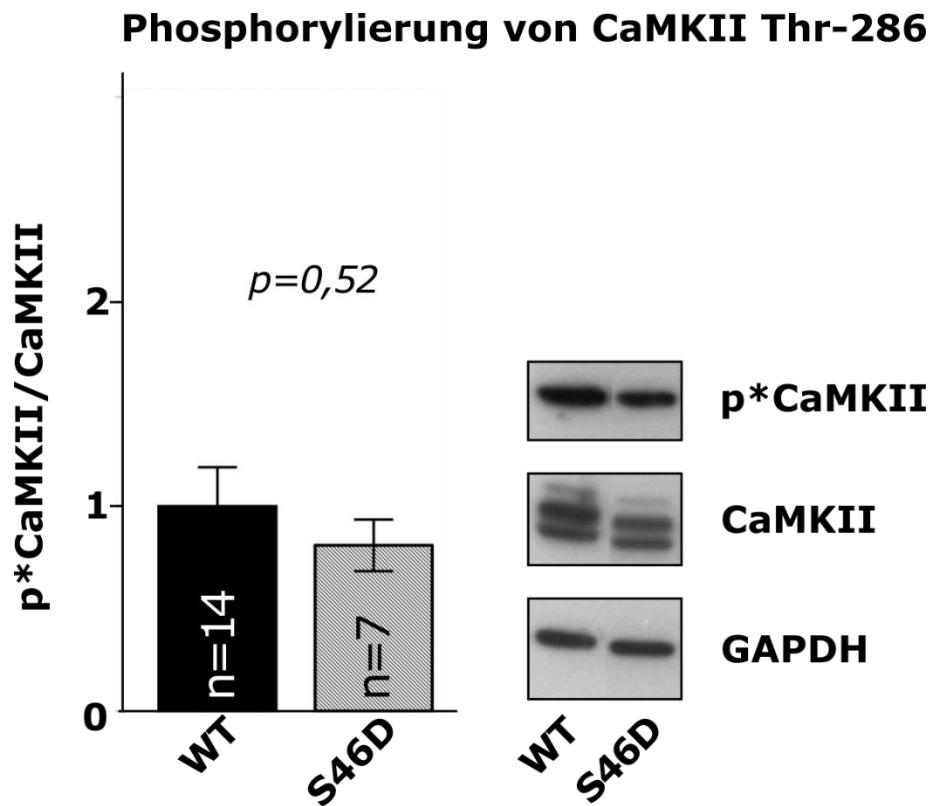


Abbildung 24. Einfluss der S46D-Mutation auf die Autophosphorylierung der CaMKII.

Auch der L-Typ-Calciumkanal (CaV1.2) zeigte an Stelle Thr-498 beim Vergleich zwischen Wildtyp und S46D-I-1 kein statistisch signifikant verändertes Phosphorylierungsmuster (Abbildung 25).

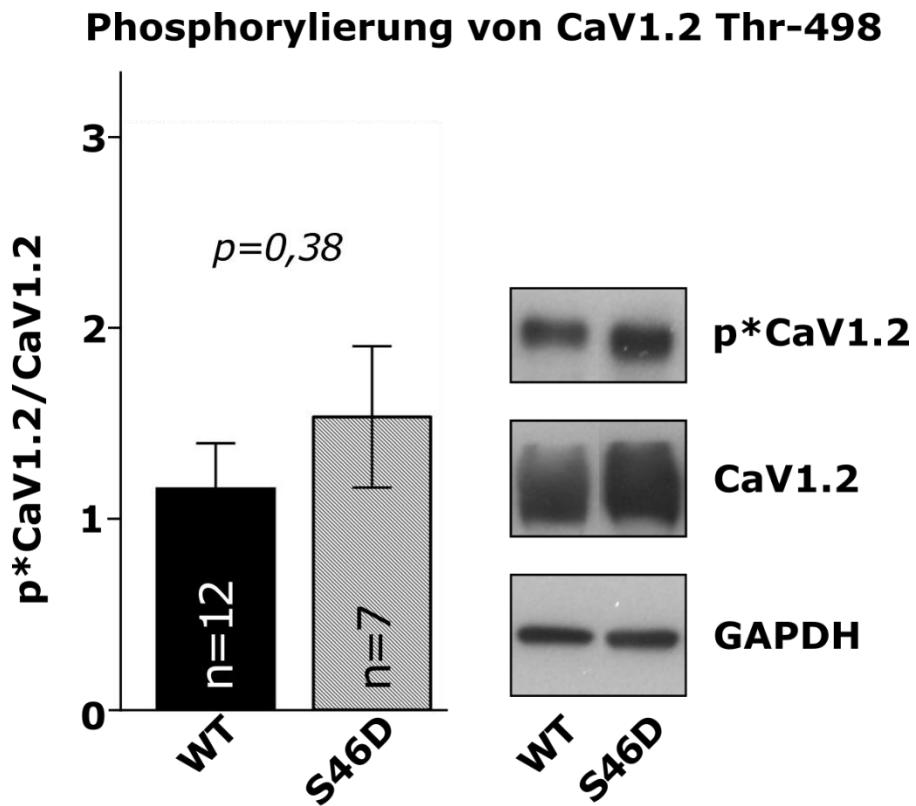


Abbildung 25. Einfluss der S46D-Mutation auf die Phosphorylierung von CaV1.2.

Ein **statistisch signifikanter** Unterschied ($p=0,038$) ergab sich bei der Betrachtung der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle des PLB (Ser-16). Hier konnte mittels Western-Blot eine vermehrte Phosphorylierung von PLB Ser-16 unter Einfluss der phosphomimetisch aktiven I-1-S46D-Variante im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Abbildung 26).

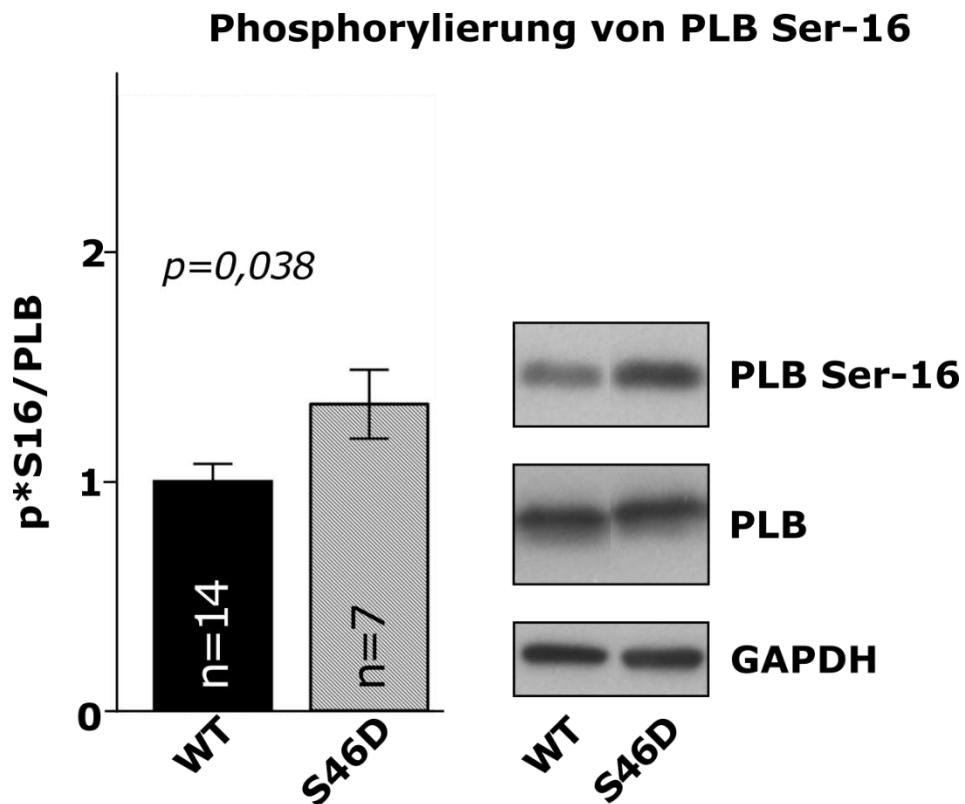


Abbildung 26. Einfluss der S46D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Ser-16.

Auf die Phosphorylierung von PLB an der CaMKII-abhängigen Thr-17 Phosphorylierungsstelle hatte S46D-I-1 dagegen keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 27).

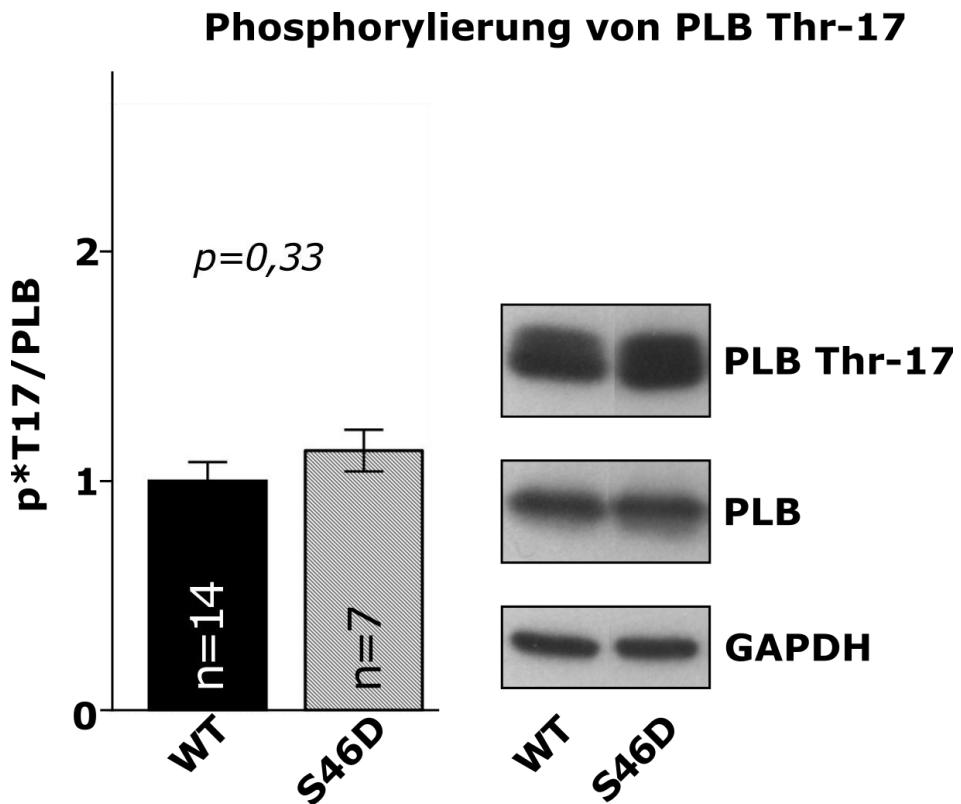


Abbildung 27. Einfluss der S46D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Thr-17.

Zusammenfassend lässt sich für I-1-S46D eine statistisch signifikante, vom Ausmaß her aber eher nur gering vermehrte Phosphorylierung des PLB an der PKA-abhängigen Stelle Ser-16 nachweisen, während sich an der CaMKII-Stelle Thr-17 kein signifikanter Effekt zeigte, obgleich auch diese Stelle bekanntermaßen durch die PP-1 dephosphoryliert wird. (77,78)

3.3.3. Einfluss der S47D-Mutation von Inhibitor-1

Die adenoviral induzierte Expression von S47D-mutiertem I-1 hatte im Vergleich zu Wildtyp-I-1 keinen signifikanten Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Ryanodinrezeptors an der Stelle Ser-2808 (Abbildung 28).

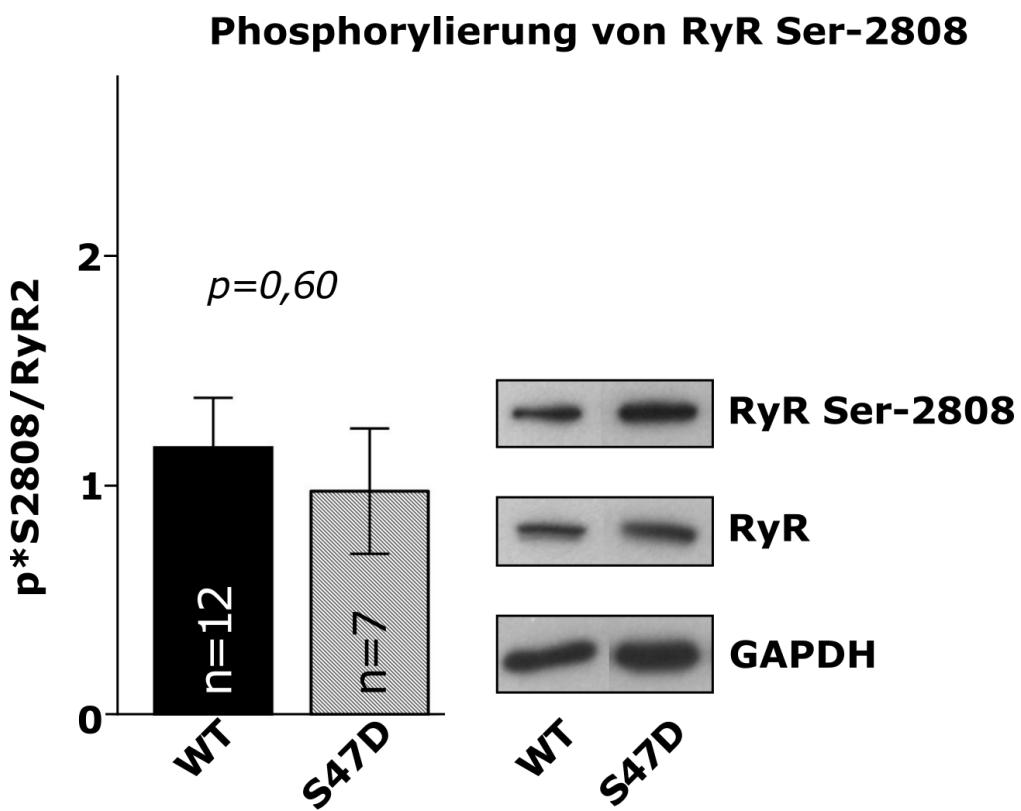


Abbildung 28. Einfluss der S47D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2808.

Auch die Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors an Stelle Ser-2814 wurde durch S47D-I-1 nicht signifikant verändert im Vergleich zu Wildtyp I-1 (Abbildung 29).

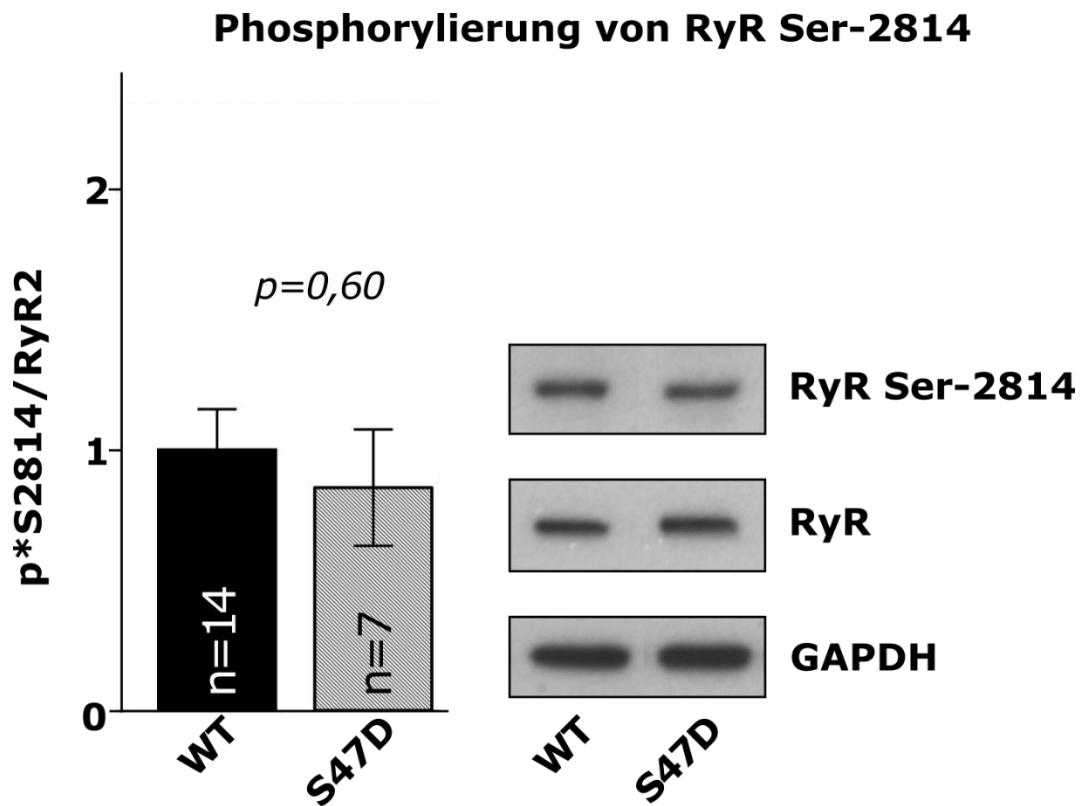


Abbildung 29. Einfluss der S47D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2814.

Ebenso wie bei den anderen untersuchten phosphomimetisch aktiven I-1 Varianten konnte für I-1-S47D keine veränderte Aktivierung der CaMKII, wie sie durch Auto-Phosphorylierung von Thr-286 angezeigt würde, festgestellt werden (Abbildung 30).

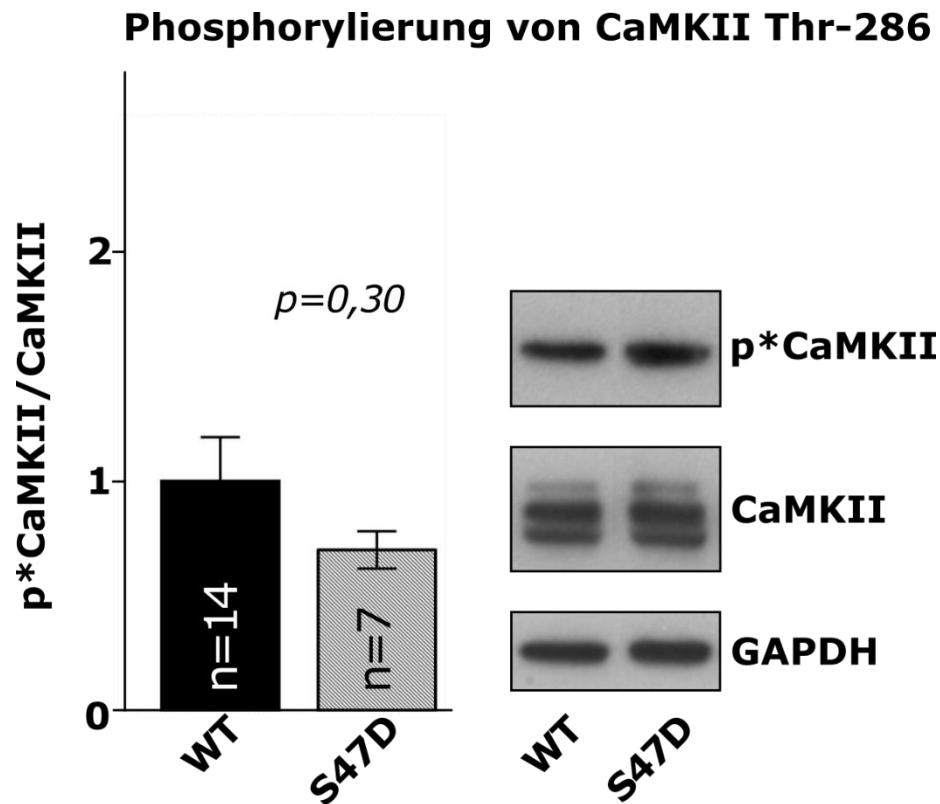


Abbildung 30. Einfluss der S47D-Mutation auf die Autophosphorylierung der CaMKII.

Für die Phosphorylierung des CaV1.2 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp I-1 und I-1-S47D gezeigt werden (Abbildung 31).

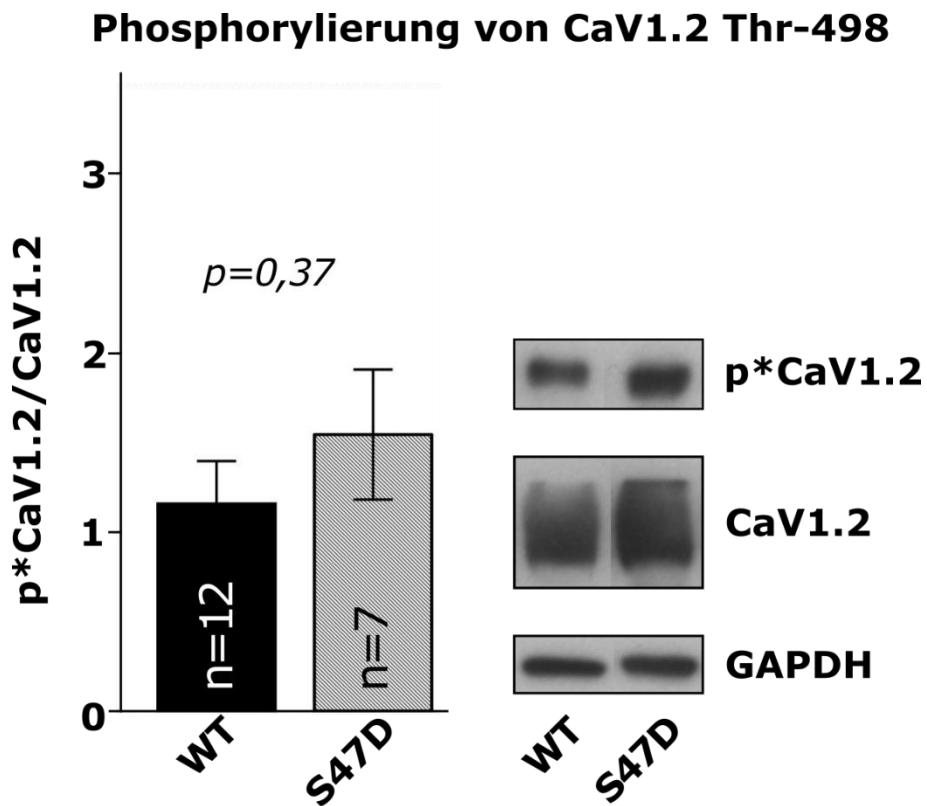


Abbildung 31. Einfluss der S47D-Mutation auf die Phosphorylierung von CaV1.2.

Sowohl für die PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle des PLB (Ser-16) wie auch für die CaMKII-abhängige Stelle Thr-17 ließen sich keine unterschiedlichen Phosphorylierungsniveaus im Vergleich zwischen der Variante I-1-S47D und Wildtyp I-1 messen (Abbildung 32 und 33).

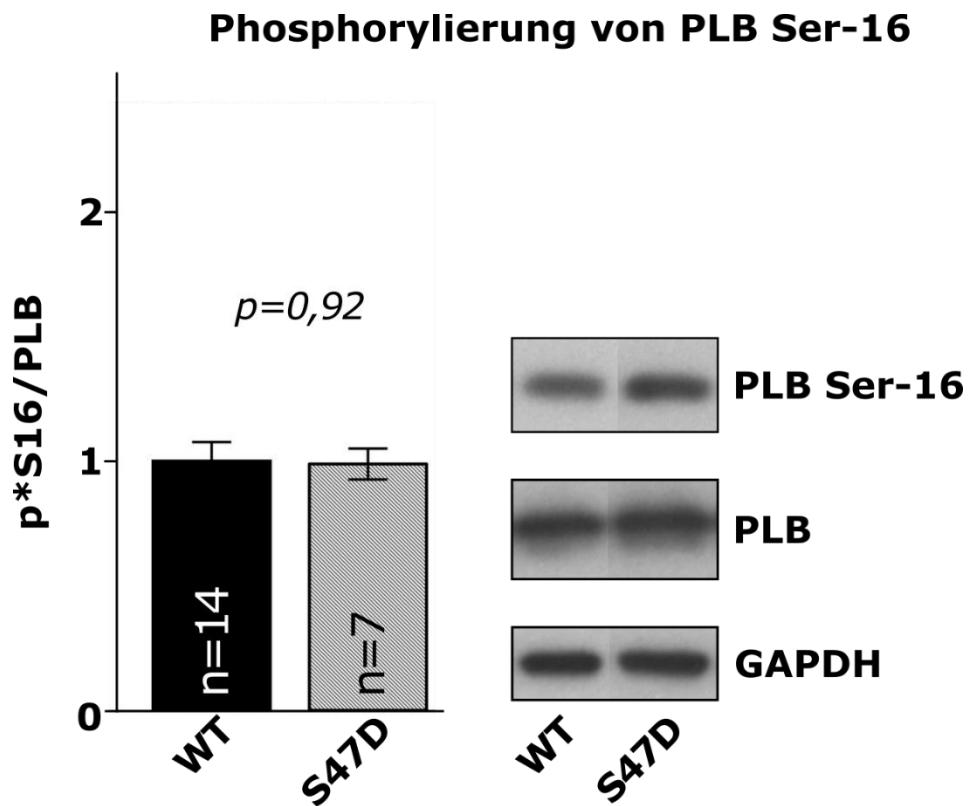


Abbildung 32. Einfluss der S47D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Ser-16.

Phosphorylierung von PLB Thr-17

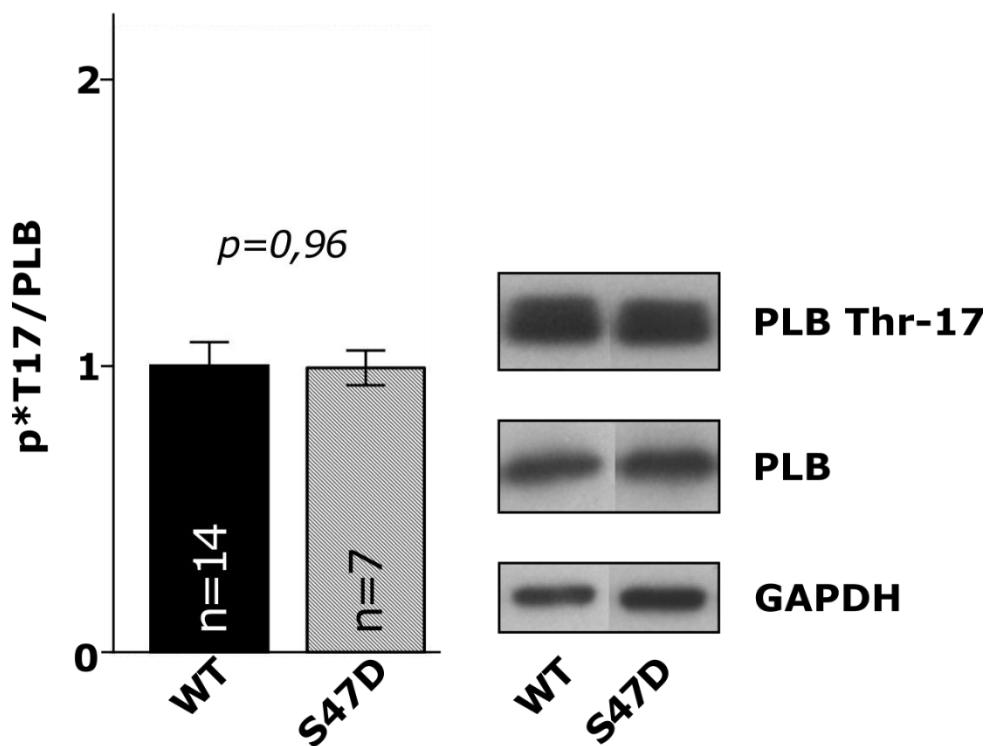


Abbildung 33. Einfluss der S47D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Thr-17.

Mittels Western-Blot konnte also in den durchgeföhrten Untersuchungen kein signifikanter Einfluss von I-1-S47D auf die Phosphorylierung der oben aufgeföhrten Zielproteine gezeigt werden.

3.3.4. Einfluss der T136D-Mutation von Inhibitor-1

Für die letzte untersuchte phosphomimetisch aktive Variante von I-1 (T136D) ließ sich kein Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Ryanodinrezeptors finden. Weder die PKA- und CaMKII-Phosphorylierungsstelle Ser-2808 noch die CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle Ser-2814 zeigten im Western-Blot einen Unterschied zwischen Wildtyp I-1 und T136D-I-1 (Abbildungen 34 und 35).

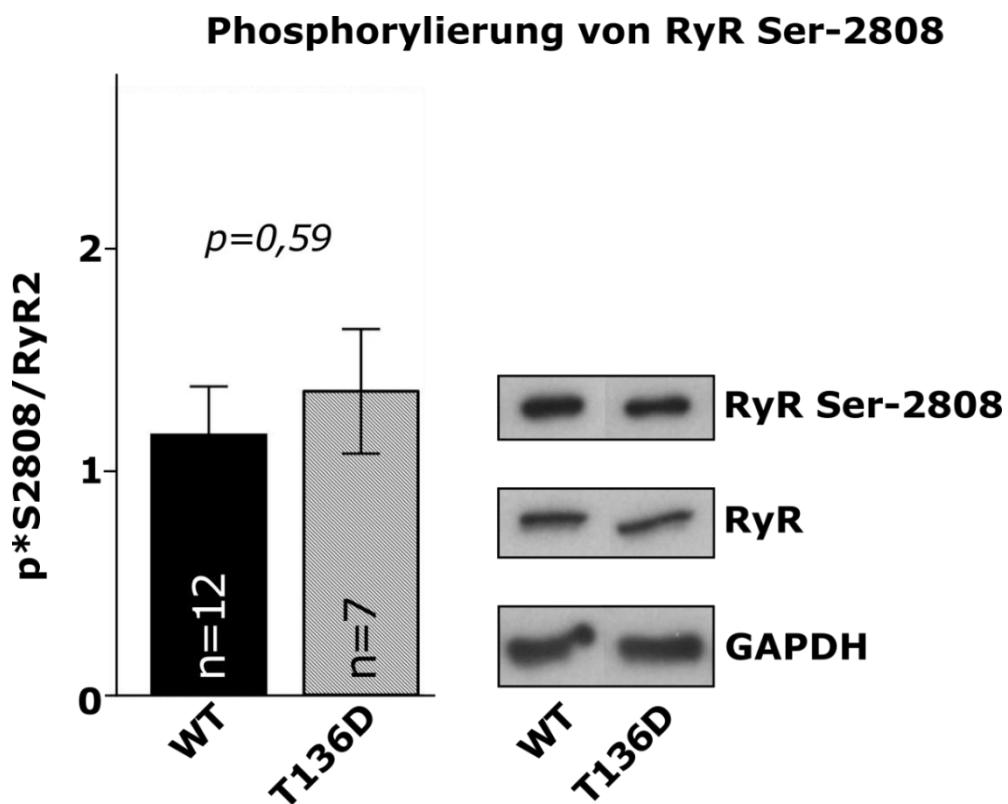


Abbildung 34. Einfluss der T136D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2808.

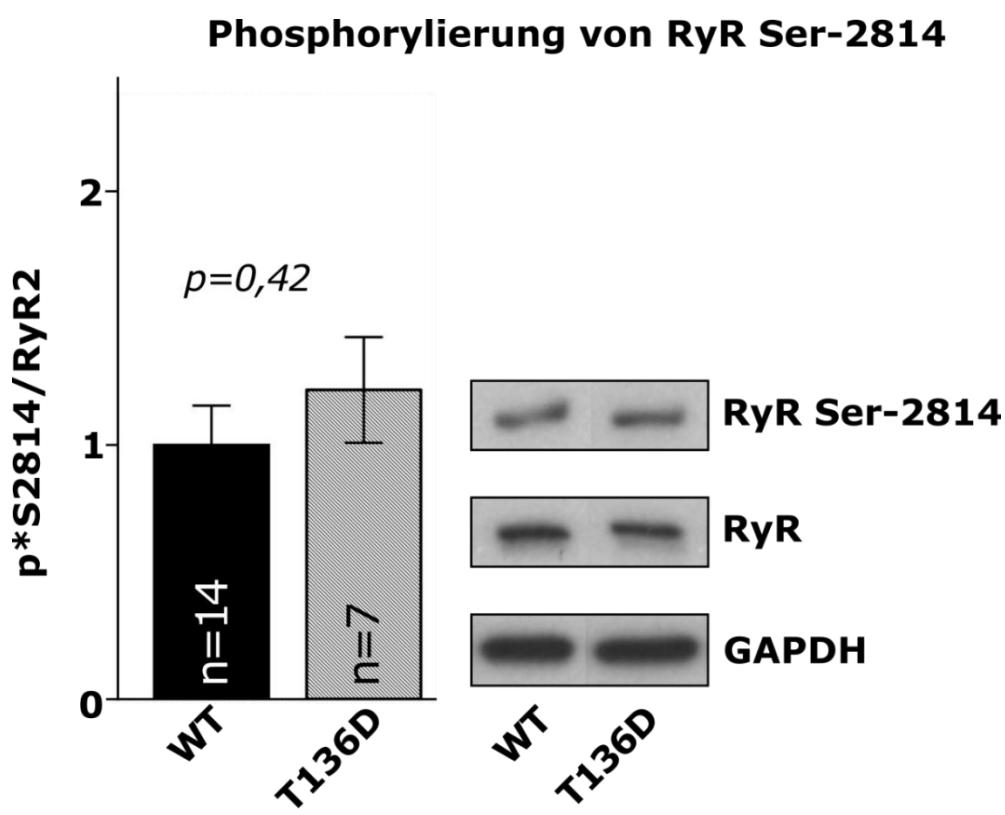


Abbildung 35. Einfluss der T136D-Mutation auf die Phosphorylierung von RyR2 Ser-2814.

An der Auto-Phosphorylierungsstelle (Thr-286) der CaMKII ließ sich unter dem Einfluss der I-1-T136D-Variante keine Veränderung des CaMKII-Aktivierungs niveaus im Vergleich zu Wildtyp I-1 detektieren (Abbildung 36).

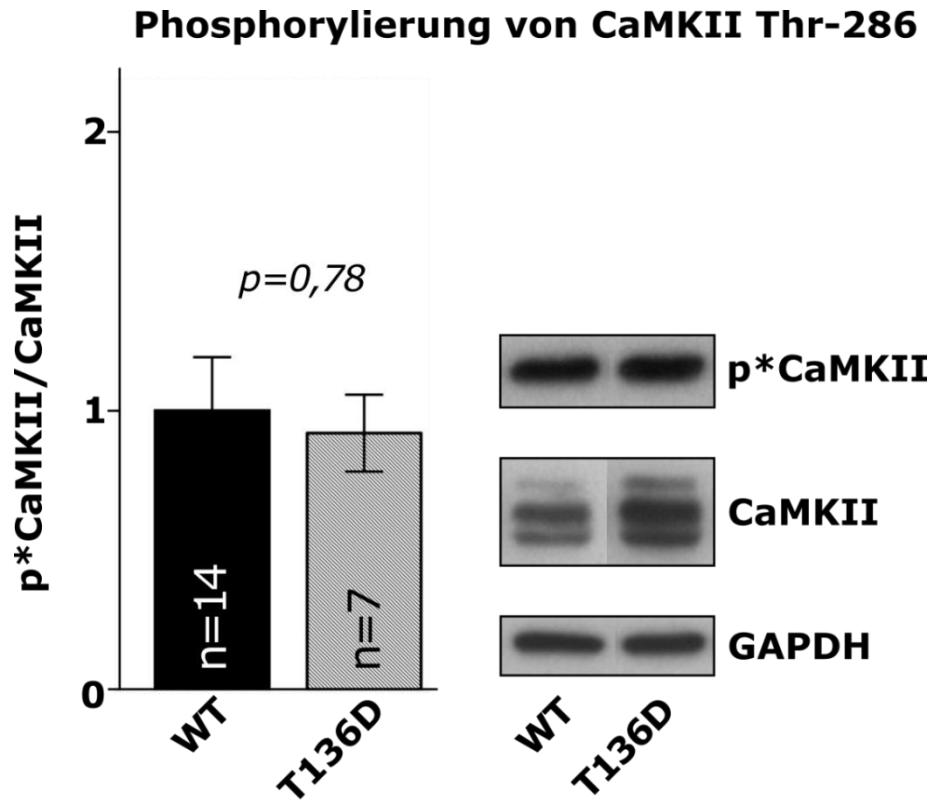


Abbildung 36. Einfluss der T136D-Mutation auf die Autophosphorylierung der CaMKII.

Am Dihydropyridin-Rezeptor (CaV1.2) war im Vergleich zwischen Wildtyp und der phosphomimetischen Variante I-1-T136D an der Phosphorylierungsstelle Thr-498 kein statistisch signifikant unterschiedliches Phosphorylierungsniveau festzustellen (Abbildung 37).

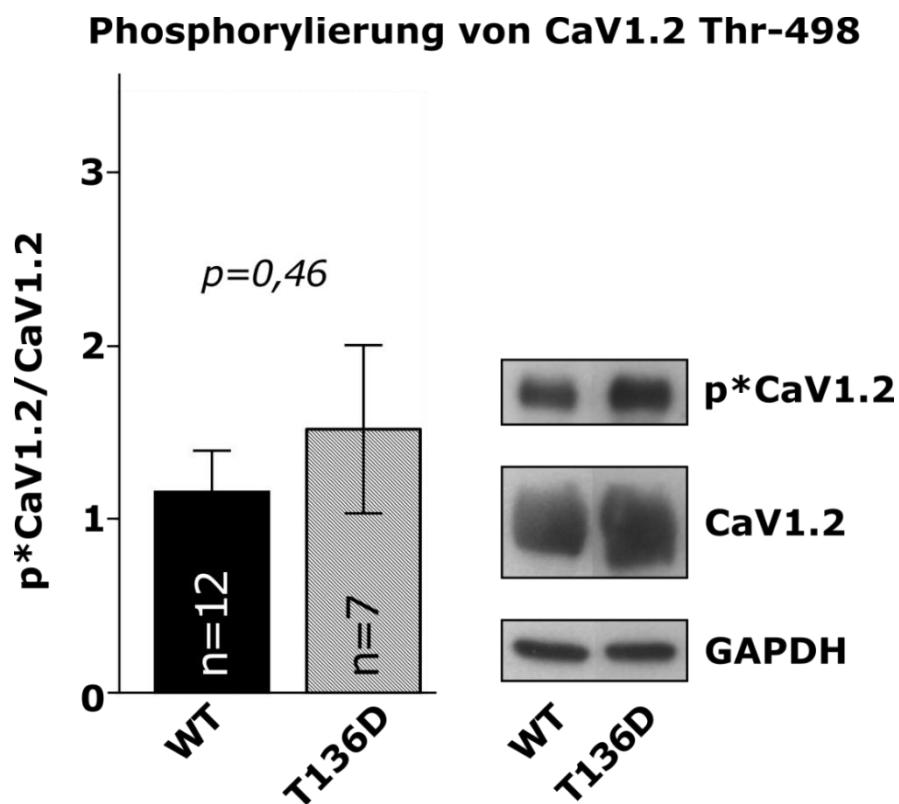


Abbildung 37. Einfluss der T136D-Mutation auf die Phosphorylierung von CaV1.2.

Auch für die Phosphorylierung der PKA-abhängigen Stelle Ser-16 des PLB konnte kein statistisch signifikanter Effekt, lediglich ein leichter Trend zu einer geringeren Phosphorylierung ($p=0,09$) unter Einfluss von T136D-I-1 im Vergleich zu Wildtyp I-1 gefunden werden (Abbildung 38).

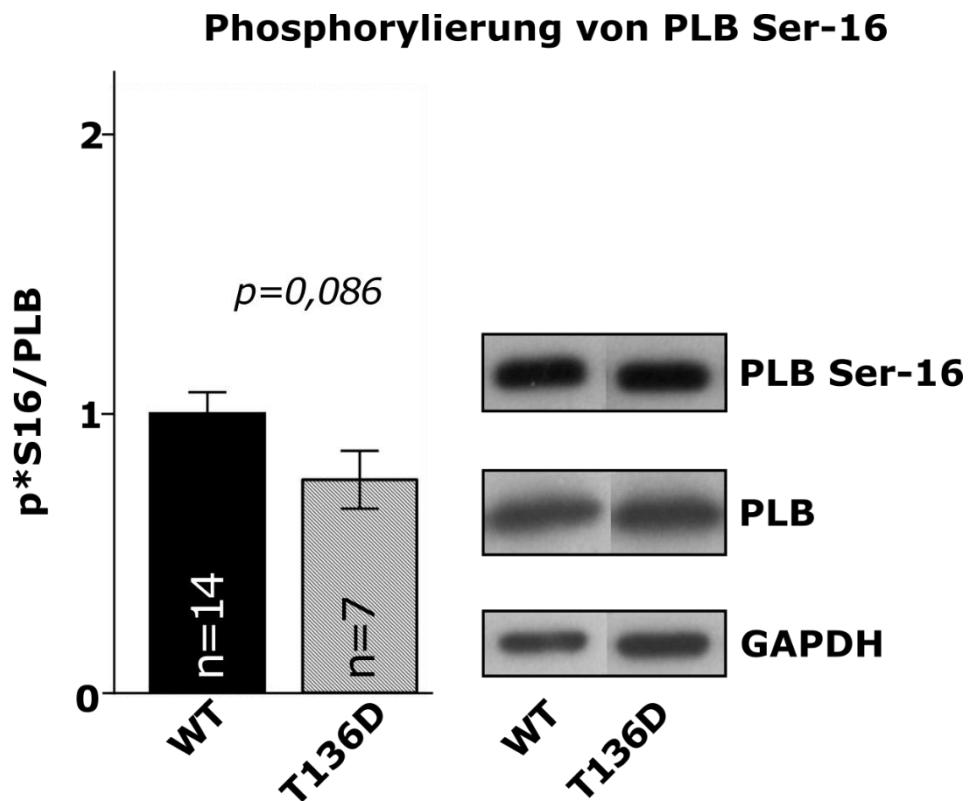


Abbildung 38. Einfluss der T136D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Ser-16.

Ebenso wie die anderen untersuchten Varianten von I-1, hatte die Expression von T136D-I-1 keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die CaMKII-abhängige Thr-17-Phosphorylierungsstelle von PLB (Abbildung 39).

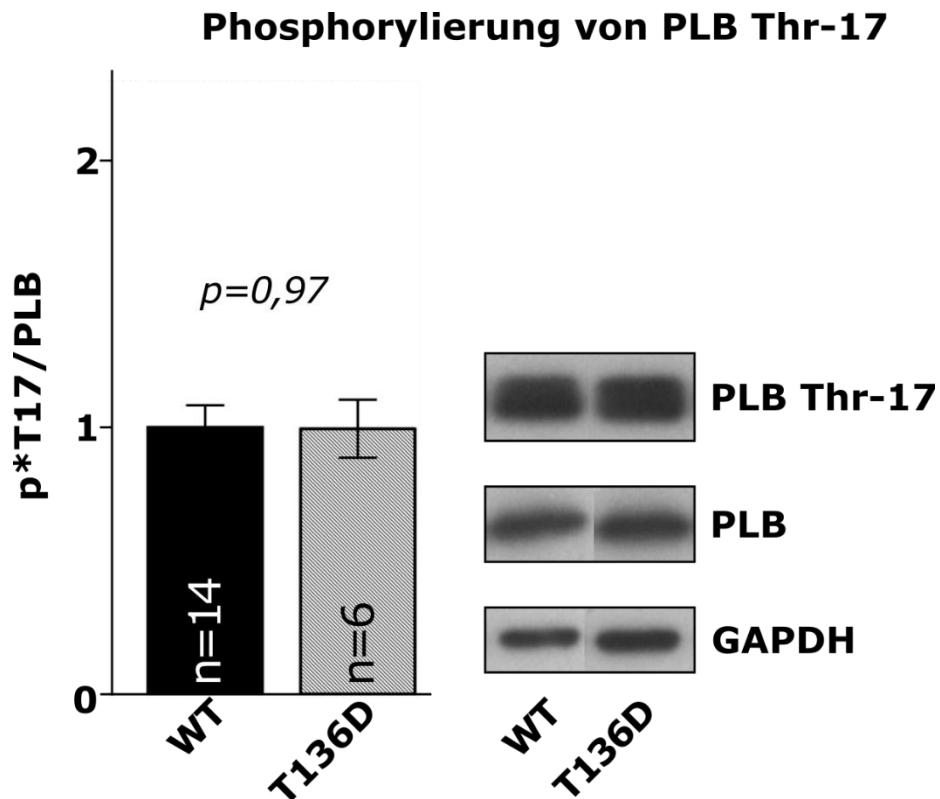


Abbildung 39. Einfluss der T136D-Mutation auf die Phosphorylierung von PLB Thr-17.

Auch für T136D-I-1 lässt sich somit mittels Western-Blot kein statistisch signifikanter Einfluss auf die untersuchten PP-1-Zielproteine nachweisen.

3.4. Ergebnisse der Phosphatase-Aktivitäts-Assays

Vorarbeiten mit Radio-Phosphor hatten nahegelegt, dass (zumindest unter experimentellen Bedingungen) die CaMKII I-1 phosphorylieren kann. Da die im vorangegangenen Abschnitt dargelegten Ergebnisse keinen Hinweis auf eine relevante Regulation der CaMKII-Aktivität infolge der untersuchten I-1-Mutationen ergeben hatten, war es Ziel dieses Versuchsteils, zu untersuchen, ob andersherum eine Erhöhung der CaMKII-Aktivität (genutztes Modell hier: transgen CaMKII-überexprimierende Kardiomyozyten aus CaMKII δ c-TG Mäusen) die Aktivität der PP-1 beeinflusst. Also ob mit einer (ca. 3-fachen) Überexpression der CaMKII überhaupt ein Einfluss auf die Aktivität der Protein-Phosphatase-1 (PP-1) besteht. Falls CaMKII-abhängige Phosphorylierung von I-1 einen relevanten Einfluss auf dessen Aktivität hat, müsste dies in einer veränderten Aktivität der PP-1 messbar sein. Um dies zu testen wurden Proben mit transgener Überexpression der CaMKII δ c (ca. 17-fach erhöhte Expression und 3-fach erhöhtes Level phosphorylierter CaMKII im Vergleich zum Wildtyp (79,80)) mit einem CaMKII-Knockout und Wildtyp-Proben verglichen.

Um isoliert die Aktivität der PP-1 messen zu können wurden zwei verschiedene Phosphatase-Hemmstoffe verwendet:

- Okadasäure hemmt bereits in Konzentrationen von 2 nM die Protein-Phosphatase 2a (PP-2a), in höheren Konzentrationen von 10 nM zusätzlich die PP-1. (73,74)
- Tautomycin inhibiert in niedrigen Konzentrationen von 3 nM bereits vollständig die PP-1, während die PP-2a erst bei deutlich höheren Konzentrationen gehemmt wird. (75)

Die Phosphatase-Assays wurden je mit zwei verschiedenen Konzentrationen der Hemmstoffe durchgeführt um isoliert die PP-1-Aktivität berechnen zu können (siehe auch Material und Methoden, Kapitel 2.3.2).

Von den drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Datensätzen wurde bei der Messung mit Okadasäure (OA) der nach 20 Minuten Reaktionszeit gewonnene Datensatz vollständig statistisch ausgewertet, da dieser die geringsten Schwankungen der Messwerte zeigte. Zwei Proben wurden ausgeschlossen, da sich bei diesen

durchgehend die Fluoreszenzen bei 10 nM OA höher zeigten als bei 2 nM OA. Zusätzlich zeigten bei diesen Proben die Einzelmesswerte unter 10 nM OA durchgehend eine hohe Standardabweichung. Dieser Messfehler ist am ehesten auf vereinzelt durch das Pipettieren im Well gebildete Schaumblasen zurückzuführen.

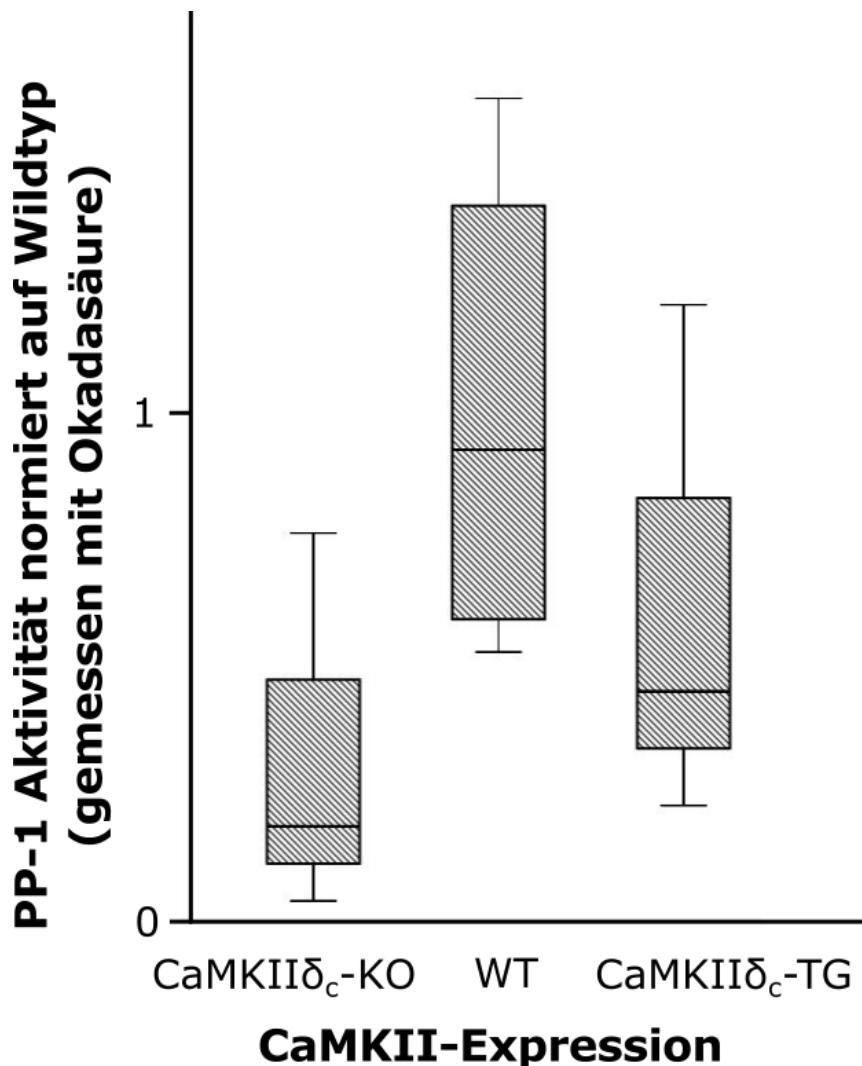


Abbildung 40. Aktivität der Protein-Phosphatase-1 (PP-1) in Abhängigkeit von der CaMKII-Expression (CaMKII δ_c -KO: n = 3, WT: n=4, CaMKII δ_c -TG: n=3).

Im Okadasäure-Assay ergab sich ein leichter Trend zu einer niedrigeren Aktivität der PP-1 in den Proben mit transgener CaMKII-Überexpression (normierte Aktivität der PP-1 bei CaMKII-Überexpression im Vergleich zum Wildtyp: 63%). Dieser Trend zeigte sich im T-Test jedoch nicht signifikant ($p = 0,38$). Ebenso zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu einer niedrigeren Aktivität der PP-1 (im Vergleich zum Wildtyp 33%) in den Proben mit CaMKII-Knockout ($p = 0,11$).

Unter Verwendung von Tautomycin stellte sich ein ähnliches Bild dar (Abbildung 41).

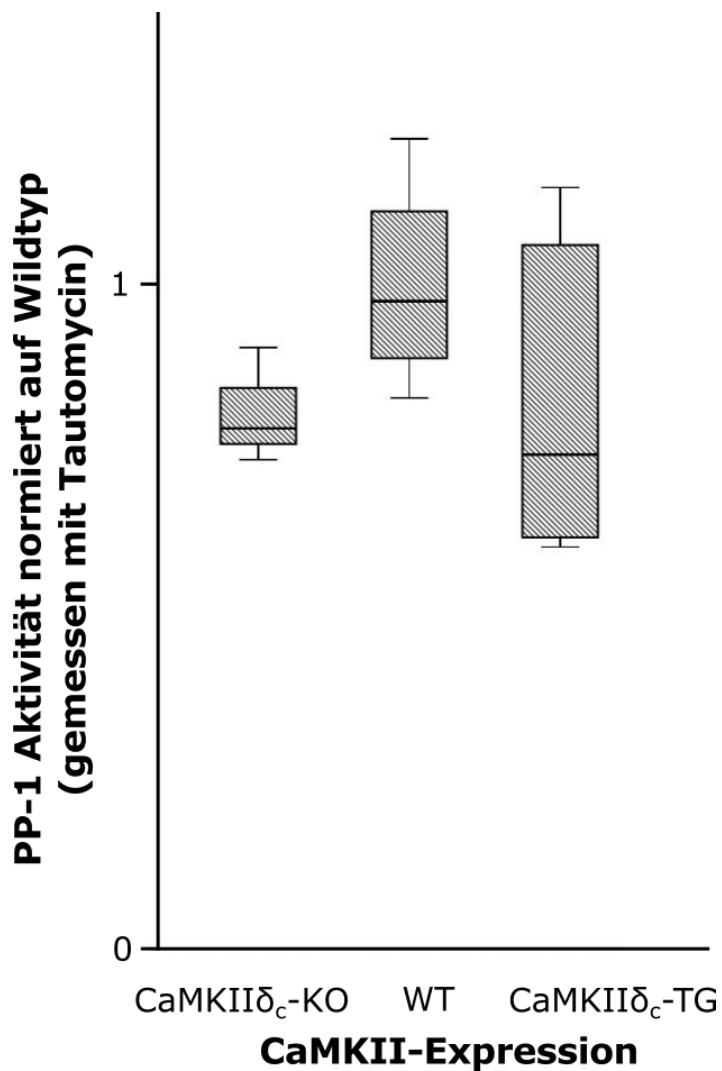


Abbildung 41. Aktivität der Protein-Phosphatase-1 (PP-1) in Abhängigkeit von der CaMKII-Expression (CaMKII δ_c -KO; n=3, WT; n=4, CaMKII δ_c -TG; n=5).

Wie bei der Untersuchung mit Okadasäure zeigte sich auch unter Verwendung von Tautomycin ein leichter Trend zu einer geringeren PP-1 Aktivität bei CaMKII-Überexpression sowie im CaMKII-Knockout. Für die Proben aus Mäusen mit Überexpression der CaMKII ergab sich eine normierte PP-1-Aktivität von 84% im Vergleich zum Wildtyp, der CaMKII-Knockout zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine normierte PP-1 Aktivität von 81%. Dieser Unterschied zum Wildtyp war jeweils statistisch nicht signifikant ($p = 0,30$ für CaMKII-Überexpression, $p = 0,13$ für CaMKII-Knockout).

4. Diskussion

Die elektromechanische Kopplung am Herzen wird wesentlich über den Phosphorylierungsgrad der hierbei beteiligten Proteine reguliert. (9) Hierfür spielt vor allem die Aktivierung von Adrenozeptoren eine wichtige Rolle. Zentrales Thema dieser Arbeit ist Proteinphosphatase-1-Inhibitor-1 (I-1). I-1 ist ein kleines Protein, welches als verstärkendes Element der adrenergen Signalkaskade fungiert. Es wird durch deren zentrale Proteinkinase, die PKA, mittels Phosphorylierung an Thr-35 aktiviert und hemmt deren Gegenspieler, die PP-1. Durch diese positive Rückkopplung wird der über Adrenozeptoren ausgelöste Effekt verstärkt und die elektromechanische Kopplung entsprechend moduliert.

Auf Grund dieser Rolle wurde in zahlreichen Vorarbeiten untersucht, ob I-1 ein therapeutisches Ziel, insbesondere bei der Herzinsuffizienz darstellen könnte. Wie bereits in Kapitel 1.5 dargestellt sind die Ergebnisse dieser Studien sehr heterogen. Mehrere Arbeiten zeigten einen nützlichen Effekt von I-1 (36,57–60), während andere Autoren zu dem Schluss kamen, dass eine Inhibition von I-1 von Vorteil sei (54–56).

In einer dieser Arbeiten wurde nachgewiesen, dass der PKA-Signalweg via I-1 einen Zugriff auf Ziele des CaMKII-Signalweges hat. (55) Wie in Kapitel 1.6 ausgeführt, zeigten bisher unpublizierte Vorarbeiten interessanterweise, dass umgekehrt auch die CaMKII I-1 phosphorylieren kann. Hierfür konnten mittels Massenspektroskopie wahrscheinliche CaMKII-Phosphorylierungsstellen in I-1 ermittelt werden, jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, ob diese einen Einfluss auf die Funktion von I-1 besitzen. Ein solcher Einfluss der CaMKII via I-1 auf Ziele der PKA ist bisher nicht belegt, wäre aber z.B. im Sinne einer negativen Rückkopplung funktionell plausibel nachvollziehbar.

Daher wurde für diese Arbeit die Hypothese postuliert, dass I-1 an Thr-42, Ser-46, Ser-47 oder Thr-136 (durch die CaMKII) phosphoryliert werden kann und dass ...

1. ... die Phosphorylierung von I-1 an einer dieser Stellen seine Funktion beeinflusst, was sich in veränderter Aktivität der PP-1 bzw. dem Phosphorylierungsgrad von durch die PP-1 dephosphorylierten Proteinen niederschlägt.
2. ... insbesondere die Phosphorylierung von I-1 an einer dieser Stellen einen Einfluss auf die Aktivität der CaMKII bzw. den Phosphorylierungsgrad von CaMKII-Targets hat.

Um diese Hypothesen zu überprüfen wurde folgende Methode gewählt: In Zellkulturen aus I-1-Knockout Mäusen wurde mittels adenoviraler Expression die Wildtyp-Variante von I-1 (als Kontrollgruppe) oder eine phosphomimetisch aktive Mutante von I-1 (T42D, S46D, S47D, T136D) in gleichem Expressionslevel exprimiert. Um Effekte besser sichtbar zu machen, wurde hierbei eine milde Überexpression (3-fach) von I-1 gewählt. Unter der Annahme, dass eine veränderte I-1-Aktivität direkt die Aktivität der PP-1 beeinflusst und sich damit letztlich der Phoshorylierungsgrad von PKA- / CaMKII- / PP-1-Zielproteinen ändert, wurde im Anschluss an die Transfektion mittels Western-Blot der Phosphorylierungsstatus verschiedener PKA- und CaMKII-Zielproteine untersucht (Details siehe Kapitel 2).

Diese Methode musste jedoch zuerst etabliert werden, da sie bisher in der Arbeitsgruppe nicht durchgeführt wurde. Hierbei zeigten sich verschiedene Herausforderungen.

Zunächst mussten die Isolationsbedingungen optimiert werden. Die Gewichte der entnommenen Herzen zeigten sich bei den Mäusen mit I-1-Knockout im Normbereich, die Verdauzeit musstet jedoch erst durch empirisches Austesten so gewählt werden, dass sich eine befriedigende Ausbeute an Zellen ergab. Eine weitere deutliche Verbesserung konnte durch die Zugabe von Heparin erzielt werden. Zuvor war der Verdau der Herzen mittels Langendorff-Perfusion mutmaßlich auf Grund von Thromben inhomogen mit entsprechenden Zellverlusten.

Zur Optimierung der Kulturbedingungen wurden verschiedene Beschichtungen der Kulturschalen und Kulturmedien getestet. Hierbei erwies sich die in Kapitel 3.1.2 präsentierte Kombination im Vergleich als beste Lösung. Dennoch kam es durch Nicht-Anhaftungen der Kardiomyozyten sowie durch deren Absterben weiterhin zu relevanten Verlusten an Zellen.

Um den hierdurch bedingten relativen Mangel an Proteinen in den nach Transfektion geernteten Zellen auszugleichen, wurde beim Western-Blot ein Gradientengel zur Auftrennung genutzt. Hierdurch, bzw. durch die so optimierte Auftrennung der Proteine, wurde es möglich, mit der vorhandenen, limitierten Proteinmenge alle gewünschten Phosphoproteine zu untersuchen. Das exakte Zuschneiden der Membranen zur Trennung der verschiedenen Proteine war teils eine Herausforderung, jedoch konnte nur so die Anzahl der benötigten Tiere in einem realistischen Rahmen gehalten werden, ohne auf einen Teil der Ergebnisse zu verzichten.

Jede Isolation ergab methodenbedingt eine schwankende Zellzahl. Um dennoch ein gleichbleibendes Expressionsniveau von I-1 zu gewährleisten, wurde die Zellzahl nach jeder Isolation mit einem Mikroskop bestimmt und die zugegebene Virusmenge entsprechend angepasst. Es zeigte sich bei diesem Prozedere nur eine geringe Abweichung der einzelnen Ergebnisse, so dass dieses Vorgehen eine pragmatische Lösung mit relativ geringem Fehler darstellt.

Beim Western-Blot ergab sich bei den verschiedenen untersuchten Proteinen eine unterschiedliche Signalqualität. So zeigte sich teils ein schwaches Signal von I-1. Dieser Befund passt zu den in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten beim Blotting von I-1. (42) Auch die Signalqualität der Phosphoproteine war, wie aus anderen Arbeiten bekannt, je nach Protein unterschiedlich. So präsentierte sich z.B. in allen Untersuchungen mit PLB ein qualitativ gutes Ergebnis, während bei CaV1.2 die Qualität durchwegs mäßig bis schlecht war (wobei hierfür ein kein dedizierter Antikörper zur Verfügung steht, sondern der Antikörper für phospho-CaMKII aufgrund seiner Kreuzreaktion genutzt wurde (71,72)). PLB stellt jedoch einen guten Marker für die globale Aktivität der PKA sowie der CaMKII dar (63,81), somit ist anzunehmen, dass auch mit den teils schwankenden Ergebnissen der verschiedenen im Western-Blot untersuchten Proteine eine relevante Regulation erkennbar sein sollte.

Im Western-Blot zeigten sich für die untersuchten Phosphoproteine folgende Ergebnisse:

- Mit den Mutanten T42D, S47D und T136D waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar.
- Unter dem Einfluss von I-1 S46D zeigte sich PLB an Stelle Ser-16 signifikant vermehrt phosphoryliert ($p = 0,038$).

Für den I-1-Knockout konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass PLB Ser-16 vermindert phosphoryliert ist (54), daher würde die vermehrte Phosphorylierung von PLB Ser-16 unter dem Einfluss von I-1 S46D zu einem aktivierenden Einfluss dieser Phosphorylierung auf I-1 passen.

Rein statistische Überlegungen führen jedoch zu Zweifeln an der Bedeutung der signifikant vermehrten Phosphorylierung von PLB Ser-16 unter I-1 S46D. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem üblichen Signifikanzniveau von 5%, also wäre rein mathematisch bei jedem 20. untersuchten Wertepaar ein falsch positiver Befund zu erwarten. Bei insgesamt 24 ausgewerteten Phosphorylierungsstellen erscheint dies nicht unwahrscheinlich. Hierfür spricht auch, dass kein anderes PKA-Zielprotein (insbesondere auch nicht RyR2 Ser-2808) unter der S46D-Mutante signifikant verändert phosphoryliert war.

Vor allem aber spricht gegen einen tatsächlichen Effekt von I-1 S46D auf PLB Ser-16 weiterhin die unveränderte Thr-17-Phosphorylierung von PLB. Beide PLB-Phosphorylierungsstellen werden von der PP-1 dephosphoryliert. (77,78) Eine veränderte I-1-Aktivität müsste also über ihren Einfluss auf die PP-1 sowohl PLB Ser-16 als auch PLB Thr-17 beeinflussen.

Auch zeigt sich z.B. unter I-1 T136D PLB Ser-16 im Trend etwas weniger phosphoryliert ($p=0,09$) bei jedoch unveränderter Phosphorylierung von PLB Thr-17 und RyR2 Ser-2808. Dies spricht ebenso für eine rein statistische Schwankung ohne echte Signifikanz.

Eine mögliche Erklärung, welche für einen tatsächlichen Effekt der isoliert vermehrten Phosphorylierung von PLB Ser-16 unter I-1 S46D spricht, liegt in der Phosphorylierungsstelle Ser-2808 des RyR2 bedingt. So ist RyR2 Ser-2808 neben der PKA auch ein CaMKII-Target. (28) Somit wäre z.B. mittels kompensatorisch

gesteigerter Ser-2808-Phosphorylierung durch die CaMKII ein (scheinbar) isoliert vermehrt phosphoryliertes PLB-Ser-16 bei unverändertem RyR2 Ser-2808 erklärbar.

Falls I-1 S46D einen Einfluss auf die PLB Ser-16 Phosphorylierung hätte, würde dieses gegen die These einer negativen Rückkopplung von CaMKII via I-1 auf PKA-Ziele sprechen und im Gegensatz zu einem verstärkenden Effekt der CaMKII-Phosphorylierung an I-1 Ser-46 passen.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse des Western-Blots festgestellt werden, dass die untersuchten CaMKII-Phosphorylierungsstellen von I-1 zumindest keinen starken globalen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von PKA- / CaMKII- / PP1-Targets haben, wenn auch eine lokale Regulation auf einzelne Zielproteine nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Zur Fragestellung, ob die Aktivität der CaMKII durch die verschiedenen phosphomimetisch aktiven Varianten von I-1 beeinflusst wird, wurden zwei Parameter betrachtet. Zum einen stellt von den in dieser Arbeit untersuchten Phosphoproteinen PLB Thr-17 den besten Surrogatmarker für die CaMKII-Aktivität dar. (63,81) Insbesondere RyR2 Ser-2814 ist hierfür schlechter geeignet, da es auch von anderen Kinasen phosphoryliert wird. (26) Zum anderen wurde direkt die Aktivität der CaMKII über das Phosphorylierungslevel ihrer Thr-286 Autophosphorylierung gemessen. In keiner der untersuchten I-1 Mutanten zeigte sich ein relevanter Trend zu einem veränderten Aktivierungsstatus der CaMKII (gemessen über die Autophosphorylierung der CaMKII an Thr-286) oder zu einer veränderten CaMKII-Aktivität (gemessen über den Readout der PLB Thr-17 Phosphorylierung).

Somit ist kein relevanter Einfluss der verschiedenen untersuchten I-1-Phosphorylierungsstellen auf die CaMKII-Aktivität anzunehmen.

Falls die CaMKII über die Phosphorylierung von I-1 einen Zugriff auf die Aktivität der PP-1 hat, dann müsste zumindest bei einer deutlichen Erhöhung der CaMKII-Aktivität (Herzen mit deutlicher CaMKII-Überexpression) die Aktivität der PP-1 beeinflusst werden. Um dies zu überprüfen, wurde in der nächsten Untersuchung die Aktivität der PP-1 mit Hilfe der spezifischen PP-1 Inhibitoren Okadasäure und Tautomycin direkt mittels eines Phosphatase-Assays gemessen. Diese Methode wurde bereits in anderen Arbeiten zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität verwendet. (62)

Hierbei zeigte sich mit beiden Hemmstoffen allenfalls ein minimaler, jedoch weit vom Signifikanz-Niveau entfernter Trend ($p = 0,38$ und $p = 0,30$) zu einer niedrigeren PP-1 Aktivität unter deutlicher CaMKII-Überexpression. In der gegensinnigen Konstellation, also bei Proben mit CaMKII-Knockout, zeigte sich zudem ebenfalls ein Trend zu einer niedrigeren PP-1 Aktivität ($p = 0,11$ und $p = 0,13$). Somit ist die veränderte PP-1 Aktivität vermutlich nicht als Effekt der veränderten CaMKII-Aktivität zu werten. Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass im CaMKII-Knockout eine deutlich erhöhte Expression von I-1 nachgewiesen wurde. (63)

Daher lässt sich zusammenfassend feststellen, dass selbst eine deutliche, transgene Überexpression der CaMKII oder umgekehrt der Knockout der CaMKII δ die Aktivität der PP-1 nicht signifikant beeinflussen.

Summarisch wäre damit vermutlich auch durch eine Steigerung der n-Zahl der Transfektionsexperimente maximal ein zwar statistisch signifikantes Ergebnis, aber vermutlich kein *global* (patho-) physiologisch *relevanter* Befund zu erwarten.

Möglicherweise ist *subzellulär* dennoch ein Einfluss vorhanden. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten wäre hier zuerst an die Phosphorylierungsstelle I-1 Ser-46 zu denken. Dies wäre z.B. durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von PP-1, I-1, RyR2 und PLB denkbar.

Als mögliche Ursache für eine variable subzelluläre Verteilung dieser Proteine käme z.B. ein Protein-Scaffolding in Frage, also die lokale Komplexbildung mehrerer Proteine an einem großen „Gerüstprotein“. Hierfür erscheint beispielsweise RyR2 als ein möglicher Kandidat, da dieses Makromolekül bekannterweise mit diversen Proteinen Komplexe eingeht. (28,82) Allerdings würde eine denkbare lokale Aggregation von „aktiverem“ I-1 und RyR2 eher eine vermehrte Phosphorylierung von RyR2 und eben nicht wie beobachtet von PLB erwarten lassen.

Grundsätzlich wäre es jedoch möglich, dass eine solche kompartimentelle Regulation nicht automatisch im „globalen“ Western-Blot nachweisbar wäre und dennoch einen funktionellen Einfluss besitzen könnte. Um dies nachzuweisen, müssten aber aufwändig subzelluläre Fraktionen gewonnen werden, was einen erheblichen Mehrbedarf an Probenmaterial und weitaus höheren technischem Aufwand bedingt hätte. Dies war im Rahmen des vorliegenden Projekts jedoch nicht umsetzbar und auch nicht sinnvoll durchführbar.

Für die zuvor aufgestellten Hypothesen zeigt sich damit in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit:

1. Die Phosphorylierung von I-1 an den untersuchten Stellen führt zu keiner großen globalen Änderung der PP-1 Aktivität bzw. zu keiner global messbaren Veränderung des Phosphorylierungsgrades von durch die PP-1 dephosphorylierten Proteinen. Möglicherweise besteht ein kleiner oder lokaler Effekt von I-1 Ser-46, dieser lässt sich aber nicht einwandfrei nachweisen und dürfte funktionell kaum relevant sein.
2. Die Phosphorylierung von I-1 an den untersuchten Stellen hat keinen nachweisbaren Effekt auf die Aktivität der CaMKII bzw. auf den Phosphorylierungsgrad von CaMKII-Targets.

Auch wenn in dieser Dissertation in Summe keine große globale Regulation der untersuchten Zielproteine gefunden werden konnte, so konnte letztlich doch I-1 Ser-46 als mögliches Ziel für weitere Untersuchungen herausgearbeitet werden. Konkret könnten Folgeuntersuchungen z.B. auf mittels Zentrifugation gewonnene Zell-Fraktionen abzielen, um eine möglicherweise vorhandene subzelluläre Regulation weitergehend zu untersuchen.

Außerdem erscheint die hier vorgestellte Methode tauglich um auch andere, z.B. im Rahmen der Forschung zur Herzinsuffizienz relevanten Proteine auf den Einfluss bestimmter Phosphorylierungsstellen hin zu untersuchen. So können mit dieser Methodik auch mit begrenzten Ressourcen gleich mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen auf das Vorhandensein eines regulierenden Effektes hin untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Proteinphosphatase-1-Inhibitor-1 (I-1) ist ein Protein, welches die elektromechanische Kopplung moduliert: Es wird von der PKA an Stelle Thr-35 mittels Phosphorylierung aktiviert und hemmt dann deren Gegenspieler, die PP-1. Somit bewirkt es eine positive Rückkopplung und Verstärkung des PKA-Signalweges. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die CaMKII über weitere, bisher nicht untersuchte Phosphorylierungsstellen von I-1 einen funktionellen Einfluss auf dessen Funktion hat. Hierzu wurde in Zellkulturen aus I-1-Knockout Mäusen mittels adenoviraler Expression die Wildtyp-Variante von I-1, sowie verschiedene phosphomimetisch aktive Mutanten von I-1 (T42D, S46D, S47D, T136D) exprimiert und anschließend Zielproteine des PKA- und CaMKII-Signalweges mittels Western-Blotting untersucht. Hierbei zeigte lediglich in der I-1 S46D Mutante PLB an Stelle Ser-16 eine in kleinem, aber signifikantem ($p = 0,038$) Umfang vermehrte Phosphorylierung. Da jedoch die ebenfalls durch die PP-1 regulierte unmittelbar benachbarte Thr-17 Stelle keine signifikante Veränderung zeigte (minimaler Trend zu minimal höherem Phosphorylierungsniveau) ist unklar, ob es sich hierbei angesichts der Vielzahl der untersuchten Mutanten und Zielproteine nicht nur um eine statistische Schwankung ohne tatsächlichen Effekt handelt. Hinweise auf einen starken, globalen Einfluss auf die untersuchten Zielproteine zeigten sich nicht. Auch ergab sich kein Hinweis auf eine relevante Veränderung der CaMKII-Aktivität (gemessen durch die CaMKII Thr-286 Autophosphorylierung und mit der PLB Thr-17 Phosphorylierung als Surrogatparameter) durch die untersuchten I-1-Mutanten.

Mittels Phosphatase-Assay und der PP-1 spezifischen Inhibitoren Okadasäure und Tautomycin wurde untersucht, ob eine massive, transgene Überexpression der CaMKII einen Einfluss auf die Aktivität der PP-1 hat. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Einfluss der CaMKII-Überexpression auf die PP-1 Aktivität. Somit scheint die CaMKII die Aktivität der PP-1 nicht global in wesentlichem Maße zu beeinflussen.

Möglicherweise ist jedoch auf subzellulärer Ebene eine kompartimentelle Regulation vorhanden, welche sich im „globalen“ Western-Blot nicht nachweisen lässt. Somit wäre für die weitergehende Untersuchung, insbesondere der I-1 Ser-46 Phosphorylierung eine Aufteilung der Zellfraktionen z.B. mittels Zentrifugation interessant, dies war jedoch vom Umfang her in der vorliegenden Arbeit nicht realisierbar.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
I-1	Proteinphosphatase-1-Inhibitor-1
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein-C
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger
NMR	Kernspinresonanz
PP-1	Proteinphosphatase-1
PP-2A	Proteinphosphatase-2A
PP-2B	Proteinphosphatase-2B
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
Ser	Serin
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAC	transverse aortic constriction
Thr	Threonin
TnI	Troponin I

6.2. Liste der verwendeten Antikörper

Primärantikörper:

Protein	Hersteller	Spezies	Konzentration Primär-AK	Sekundär-AK
GAPDH	abcam (ab8245)	Mouse	1:30.000	M1, 1:20.000
CSQ	Thermo Fisher (PA1-913)	Rabbit	1:10.000	R2, 1:10.000
RyR2	Sigma-Aldrich (HPA020028)	Rabbit	1:10.000	R1, 1:10.000
CaV1.2	alomone labs (ACC-013)	Rabbit	1:200	R2, 1:5.000
CaMKII	nichtkommerzieller Antikörper von Prof. D.M. Bers (Davis, USA)	Rabbit	1:5.000	R1, 1:15.000
I-1	abcam (ab40877)	Rabbit	1:5.000	R2, 1:5.000
PLB	Badrilla (A010-14)	Maus	1:5.000	M1, 1:10.000
RyR2 Ser-2808	Badrilla (A010-30)	Rabbit	1:6.666	R1, 1:10.000
RyR2 Ser-2814	Badrilla (A010-31AP)	Rabbit	1:3.333	R2, 1:10.000
CaMKII Thr-286	Thermo Scientific (MA1-047)	Mouse	1:1.000	M1, 1:5.000
CaV1.2 Thr-498	Thermo Scientific (MA1-047) (71,72)	Mouse	1:1.000	M2, 1:5.000
PLB Ser-16	Badrilla (A010-12AP)	Rabbit	1:6.666	R1, 1:10.000
PLB Thr-17	Badrilla (A010-13AP)	Rabbit	1:6.666	R1, 1:10.000

Sekundärantikörper:

Antikörper	Abk.	Hersteller	Spezies
Anti-Mouse IgG HRP	M1	GE Healthcare (NA931VS)	Sheep Anti-Mouse
Anti-Mouse IgG HRP	M2	abcam (ab98799)	Donkey Anti-Mouse
Anti-Rabbit IgG HRP	R1	GE Healthcare (NA934VS)	Donkey Anti-Rabbit
Anti-Rabbit IgG HRP	R2	abcam (ab97085)	Donkey Anti-Rabbit

Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2019 [Internet]. 2020 [updated 2020 Nov 30; cited 2021 May 9]. Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html
2. Statistisches Bundesamt. Vollstationäre Patientinnen und Patienten der Krankenhäuser [Internet]. 2021 [updated 2021 Feb 18; cited 2021 May 9].
3. Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, Islam S, Mente A, Hystad P, Brauer M, Kutty VR, Gupta R, Wielgosz A, AlHabib KF, Dans A, Lopez-Jaramillo P, Avezum A, Lanas F, Oguz A, Kruger IM, Diaz R, Yusoff K, Mony P, Chifamba J, Yeates K, Kelishadi R, Yusufali A, Khatib R, Rahman O, Zatonska K, Iqbal R, Wei L, Bo H, Rosengren A, Kaur M, Mohan V, Lear SA, Teo KK, Leong D, O'Donnell M, McKee M, Dagenais G. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet.* 2020;395(10226):795–808. doi:10.1016/S0140-6736(19)32008-2
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2016;37(27):2129–200. doi:10.1093/eurheartj/ehw128 Cited in: PubMed; PMID 27206819.
5. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsson T, Escaned J, Gersh BJ, Svitil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J, Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes.

Eur Heart J. 2020;41(3):407–77. doi:10.1093/eurheartj/ehz425 Cited in: PubMed; PMID 31504439.

6. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, Simone G de, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsiofis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 2018;39(33):3021–104. doi:10.1093/eurheartj/ehy339 Cited in: PubMed; PMID 30165516.
7. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. N Engl J Med. 2014;371(11):993–1004. doi:10.1056/NEJMoa1409077 Cited in: PubMed; PMID 25176015.
8. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, Ponikowski P, Sabatine MS, Anand IS, Bělohlávek J, Böhm M, Chiang C-E, Chopra VK, Boer RA de, Desai AS, Diez M, Drozdz J, Dukát A, Ge J, Howlett JG, Katova T, Kitakaze M, Ljungman CEA, Merkely B, Nicolau JC, O'Meara E, Petrie MC, Vinh PN, Schou M, Tereshchenko S, Verma S, Held C, DeMets DL, Docherty KF, Jhund PS, Bengtsson O, Sjöstrand M, Langkilde A-M. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. N Engl J Med. 2019;381(21):1995–2008. doi:10.1056/NEJMoa1911303 Cited in: PubMed; PMID 31535829.
9. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002;415(6868):198–205. doi:10.1038/415198a Cited in: PubMed; PMID 11805843.
10. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Baumann R, Brenner B, Gay R, Rothenburger A, editors. Physiologie. 6th ed. Stuttgart: Thieme; 2010. 944 p. ger.
11. El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. Heart Fail Rev. 2009;14(4):225–41. doi:10.1007/s10741-008-9132-8 Cited in: PubMed; PMID 19110970.
12. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. Biochemistry.

- 1999;38(32):10361–70. doi:10.1021/bi990896o Cited in: PubMed; PMID 10441130.
13. Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(3):H769-79. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.3.H769 Cited in: PubMed; PMID 10710345.
 14. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR. PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Cell*. 2000;101(4):365–76. doi:10.1016/S0092-8674(00)80847-8
 15. Bers DM. Ryanodine receptor S2808 phosphorylation in heart failure: smoking gun or red herring. *Circ Res*. 2012;110(6):796–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265579 Cited in: PubMed; PMID 22427320.
 16. Alvarado FJ, Chen X, Valdivia HH. Ablation of the cardiac ryanodine receptor phospho-site Ser2808 does not alter the adrenergic response or the progression to heart failure in mice. Elimination of the genetic background as critical variable. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;10340–7. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.01.001 Cited in: PubMed; PMID 28065668.
 17. Moss RL, Fitzsimons DP, Ralphe JC. Cardiac MyBP-C regulates the rate and force of contraction in mammalian myocardium Cardiac Myosin Binding Protein C. *Circ Res*. 2015;116(1):183–92. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.300561 Cited in: PubMed; PMID 25552695.
 18. Lin MY, Zal T, Ch'en IL, Gascoigne NRJ, Hedrick SM. A pivotal role for the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in T cells: from activation to unresponsiveness. *J Immunol*. 2005;174(9):5583–92. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5583 Cited in: PubMed; PMID 15843557.
 19. McGargill MA, Sharp LL, Bui JD, Hedrick SM, Calbo S. Active Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II gamma B impairs positive selection of T cells by modulating TCR signaling. *J Immunol*. 2005;175(2):656–64. doi:10.4049/jimmunol.175.2.656 Cited in: PubMed; PMID 16002660.
 20. Yamauchi T. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and

memory. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(8):1342–54. doi:10.1248/bpb.28.1342 Cited in: PubMed; PMID 16079472.

21. Fährmann M, Kaufhold M-A. Functional partitioning of epithelial protein kinase CaMKII in signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(1):101–9. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.11.012 Cited in: PubMed; PMID 16406114.
22. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):919–39. doi:10.1006/jmcc.2002.2038 Cited in: PubMed; PMID 12234763.
23. Koninck P de, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science.* 1998;279(5348):227–30. doi:10.1126/science.279.5348.227 Cited in: PubMed; PMID 9422695.
24. Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther.* 2005;106(1):39–55. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.11.002 Cited in: PubMed; PMID 15781121.
25. Kranias EG, Gupta RC, Jakab G, Kim HW, Steenaart NA, Rapundalo ST. The role of protein kinases and protein phosphatases in the regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function. *Mol Cell Biochem.* 1988;82(1-2):37–44. doi:10.1007/BF00242513 Cited in: PubMed; PMID 2847012.
26. Currie S, Loughrey CM, Craig M-A, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *The Biochemical journal.* 2004;377(Pt 2):357–66. doi:10.1042/BJ20031043 Cited in: PubMed; PMID 14556649.
27. Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(1):80–5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.084 Cited in: PubMed; PMID 18755143.
28. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol.* 2014;5:101. doi:10.3389/fphar.2014.00101 Cited in: PubMed; PMID 24847270.

29. Mustroph J, Neef S, Maier LS. CaMKII as a target for arrhythmia suppression. *Pharmacol Ther.* 2017;17622–31. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.10.006 Cited in: PubMed; PMID 27742568.
30. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skårdal K, Wisløff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XHT. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res.* 2012;110(11):1474–83. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268094 Cited in: PubMed; PMID 22511749.
31. Cohen P, Cohen PT. Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem.* 1989;264(36):21435–8. Cited in: PubMed; PMID 2557326.
32. Fischer TH, Eiringhaus J, Dybkova N, Saadatmand A, Pabel S, Weber S, Wang Y, Köhn M, Tirilomis T, Ljubojevic S, Renner A, Gummert J, Maier LS, Hasenfuß G, El-Armouche A, Sossalla S. Activation of protein phosphatase 1 by a selective phosphatase disrupting peptide reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2018;20(12):1673–85. doi:10.1002/ejhf.1297 Cited in: PubMed; PMID 30191648.
33. Cohen PTW. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 2):241–56. doi:10.1242/jcs.115.2.241 Cited in: PubMed; PMID 11839776.
34. Cai W-F, Liu G-S, Lam CK, Florea S, Qian J, Zhao W, Pritchard T, Haghghi K, Lebeche D, Lu LJ, Deng J, Fan G-C, Hajjar RJ, Kranias EG. Up-regulation of micro-RNA765 in human failing hearts is associated with post-transcriptional regulation of protein phosphatase inhibitor-1 and depressed contractility. *Eur J Heart Fail.* 2015;17(8):782–93. doi:10.1002/ejhf.323 Cited in: PubMed; PMID 26177627.
35. Kohr MJ, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT. Targeting of phospholamban by peroxynitrite decreases beta-adrenergic stimulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):353–61. doi:10.1093/cvr/cvm018 Cited in: PubMed; PMID 18006474.
36. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing S-L, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG. Type 1 phosphatase, a negative regulator of

- cardiac function. *Mol Cell Biol.* 2002;22(12):4124–35.
doi:10.1128/mcb.22.12.4124-4135.2002 Cited in: PubMed; PMID 12024026.
37. Biesiadecki BJ, Ziolo MT. Should we treat heart failure with phosphatase inhibitors? Better to start at the end. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):116–8.
doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.020 Cited in: PubMed; PMID 26497613.
38. Liu R, Correll RN, Davis J, Vagnozzi RJ, York AJ, Sargent MA, Nairn AC, Molkentin JD. Cardiac-specific deletion of protein phosphatase 1 β promotes increased myofilament protein phosphorylation and contractile alterations. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;87:204–13. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.08.018 Cited in: PubMed; PMID 26334248.
39. Aitken A, Cohen P. Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters.* 1982;147(1):54–8. doi:10.1016/0014-5793(82)81010-7
40. Cohen P, Rylatt DB, Nimmo GA. The hormonal control of glycogen metabolism: The amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Letters.* 1977;76(2):182–6. doi:10.1016/0014-5793(77)80147-6
41. Aitken A, Bilham T, Cohen P. Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem.* 1982;126(2):235–46. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06771.x Cited in: PubMed; PMID 6290217.
42. El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann W-H, Jäckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T. Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* 2003;17(3):437–9. doi:10.1096/fj.02-0057fje Cited in: PubMed; PMID 12514122.
43. Huang FL, Glinsmann WH. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem.* 1976;70(2):419–26. doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb11032.x Cited in: PubMed; PMID 188646.
44. MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ, Cohen P. Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and

inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1989;1010(2):218–26. doi:10.1016/0167-4889(89)90164-X

45. Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG, Shenolikar S. Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem.* 1990;265(23):13415–8. Cited in: PubMed; PMID 1696252.
46. Hemmings HC, Girault JA, Nairn AC, Bertuzzi G, Greengard P. Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J Neurochem.* 1992;59(3):1053–61. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb08347.x Cited in: PubMed; PMID 1353788.
47. Jiang L, Brackeva B, Ling Z, Kramer G, Aerts JM, Schuit F, Keymeulen B, Pipeleers D, Gorus F, Martens GA. Potential of protein phosphatase inhibitor 1 as biomarker of pancreatic β-cell injury in vitro and in vivo. *Diabetes.* 2013;62(8):2683–8. doi:10.2337/db12-1507 Cited in: PubMed; PMID 23557701.
48. Chyan CL, Tang TC, Chen Y, Liu H, Lin FM, Liu CK, Hsieh MJ, Shiao MS, Huang H, Lin TH. Letter to the editor: backbone ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments of inhibitor-1--a protein inhibitor of protein phosphatase-1. *J Biomol NMR.* 2001;21(3):287–8. doi:10.1023/a:1012968805525 Cited in: PubMed; PMID 11775747.
49. 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, Molkentin JD. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 2004;10(3):248–54. doi:10.1038/nm1000 Cited in: PubMed; PMID 14966518.
50. Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR, Kranias EG. Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38599–608. doi:10.1074/jbc.M604139200 Cited in: PubMed; PMID 17046826.
51. Weber S, Meyer-Roxlau S, El-Armouche A. Role of protein phosphatase inhibitor-1 in cardiac beta adrenergic pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;101:116–26. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.09.007 Cited in: PubMed; PMID 27639308.

52. Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H762-9. doi:10.1152/ajpheart.00104.2007 Cited in: PubMed; PMID 17416610.
53. El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):700–6. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.182 Cited in: PubMed; PMID 16774736.
54. El-Armouche A, Wittkötter K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T. Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2008;80(3):396–406. doi:10.1093/cvr/cvn208 Cited in: PubMed; PMID 18689792.
55. Wittkötter K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A. Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest.* 2010;120(2):617–26. doi:10.1172/JCI40545 Cited in: PubMed; PMID 20071777.
56. Schwab DM, Tilemann L, Bauer R, Heckmann M, Jungmann A, Wagner M, Burgis J, Vettel C, Katus HA, El-Armouche A, Müller OJ. AAV-9 mediated phosphatase-1 inhibitor-1 overexpression improves cardiac contractility in unchallenged mice but is deleterious in pressure-overload. *Gene Ther.* 2018;25(1):13–9. doi:10.1038/gt.2017.97 Cited in: PubMed; PMID 29350681.
57. Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz J-E, 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, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res.* 2005;96(7):756–66. doi:10.1161/01.RES.0000161256.85833.fa Cited in: PubMed; PMID 15746443.

58. Nicolaou P, Rodriguez P, Ren X, Zhou X, Qian J, Sadayappan S, Mitton B, Pathak A, Robbins J, Hajjar RJ, Jones K, Kranias EG. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2009;104(8):1012–20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.189811 Cited in: PubMed; PMID 19299645.
59. Fish KM, Ladage D, Kawase Y, Karakikes I, Jeong D, Ly H, Ishikawa K, Hadri L, Tilemann L, Muller-Ehmsen J, Samulski RJ, Kranias EG, Hajjar RJ. AAV9.I-1c delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling. *Circ Heart Fail.* 2013;6(2):310–7. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.971325 Cited in: PubMed; PMID 23271792.
60. Watanabe S, Ishikawa K, Fish K, Oh JG, Motloch LJ, Kohlbrenner E, Lee P, Xie C, Lee A, Liang L, Kho C, Leonardson L, McIntyre M, Wilson S, Samulski RJ, Kranias EG, Weber T, Akar FG, Hajjar RJ. Protein Phosphatase Inhibitor-1 Gene Therapy in a Swine Model of Nonischemic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(14):1744–56. doi:10.1016/j.jacc.2017.08.013 Cited in: PubMed; PMID 28958332.
61. Haghghi K, Pritchard TJ, Liu G-S, Singh VP, Bidwell P, Lam CK, Vafiadaki E, Das P, Ma J, Kunduri S, Sanoudou D, Florea S, Vanderbilt E, Wang H-S, Rubinstein J, Hajjar RJ, Kranias EG. Human G109E-inhibitor-1 impairs cardiac function and promotes arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):349–59. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.004 Cited in: PubMed; PMID 26455482.
62. Neef S, Heijman J, Otte K, Dewenter M, Saadatmand AR, Meyer-Roxlau S, Antos CL, Backs J, Dobrev D, Wagner M, Maier LS, El-Armouche A. Chronic loss of inhibitor-1 diminishes cardiac RyR2 phosphorylation despite exaggerated CaMKII activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017;390(8):857–62. doi:10.1007/s00210-017-1376-1 Cited in: PubMed; PMID 28451724.
63. Neef S, Sag CM, Daut M, Bäumer H, Grefe C, El-Armouche A, DeSantiago J, Pereira L, Bers DM, Backs J, Maier LS. While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;59:107–16. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.02.014 Cited in: PubMed; PMID 23473775.

64. Bergelson JM, Cunningham JA, Drouett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275(5304):1320–3. doi:10.1126/science.275.5304.1320 Cited in: PubMed; PMID 9036860.
65. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 1895;61(6):291–332. De;de. doi:10.1007/BF01812150
66. Zhao G, Qiu Y, Zhang HM, Yang D. Intercalated discs: cellular adhesion and signaling in heart health and diseases. *Heart Fail Rev.* 2019;24(1):115–32. doi:10.1007/s10741-018-9743-7 Cited in: PubMed; PMID 30288656.
67. O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol.* 2007;357:271–96. doi:10.1385/1-59745-214-9:271 Cited in: PubMed; PMID 17172694.
68. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goede NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(1):76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
69. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. 406 p. (*Experimentator*). ger.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. doi:10.1038/227680a0 Cited in: PubMed; PMID 5432063.
71. Grueter CE, Abiria SA, Wu Y, Anderson ME, Colbran RJ. Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits. *Biochemistry*. 2008;47(6):1760–7. doi:10.1021/bi701755q Cited in: PubMed; PMID 18205403.
72. Schmid E, Neef S, Berlin C, Tomasovic A, Kahlert K, Nordbeck P, Deiss K, Denzinger S, Herrmann S, Wettwer E, Weidendorfer M, Becker D, Schäfer F, Wagner N, Ergün S, Schmitt JP, Katus HA, Weidemann F, Ravens U, Maack C, Hein L, Ertl G, Müller OJ, Maier LS, Lohse MJ, Lorenz K. Cardiac RKIP induces a beneficial β-adrenoceptor-dependent positive inotropy. *Nat Med.*

2015;21(11):1298–306. doi:10.1038/nm.3972 Cited in: PubMed; PMID 26479924.

73. Cohen P, Klumpp S, Schelling DL. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Letters*. 1989;250(2):596–600. doi:10.1016/0014-5793(89)80803-8
74. Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990;15(3):98–102. doi:10.1016/0968-0004(90)90192-E
75. MacKintosh C, Klumpp S. Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. *FEBS Letters*. 1990;277(1-2):137–40. doi:10.1016/0014-5793(90)80828-7 Cited in: PubMed; PMID 2176611.
76. Doevedans P. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):34–49. doi:10.1016/S0008-6363(98)00073-X
77. Berrebi-Bertrand I, Souchet M, Camelin J-C, Laville M-P, Calmels T, Bril A. Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Letters*. 1998;439(3):224–30. doi:10.1016/s0014-5793(98)01364-7
78. Shintani-Ishida K, Yoshida K-I. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(7):743–51. doi:10.1016/j.bbadi.2011.03.014 Cited in: PubMed; PMID 21447388.
79. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela M-K, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SKG, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2(6):664–75. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.865279 Cited in: PubMed; PMID 19919992.
80. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003;92(8):912–9. doi:10.1161/01.RES.0000069686.31472.C5 Cited in: PubMed; PMID 12676814.

81. Mustroph J, Wagemann O, Lebek S, Tarnowski D, Ackermann J, Drzymalski M, Pabel S, Schmid C, Wagner S, Sossalla S, Maier LS, Neef S. SR Ca²⁺-leak and disordered excitation-contraction coupling as the basis for arrhythmogenic and negative inotropic effects of acute ethanol exposure. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:81–90. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.02.002 Cited in: PubMed; PMID 29410242.
82. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosemblit N, Marks AR. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 2001;153(4):699–708. doi:10.1083/jcb.153.4.699 Cited in: PubMed; PMID 11352932.

7. Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meiner Frau Isabell, welche mich stets in jeglicher Hinsicht mit unendlich viel Liebe unterstützt hat. Egal ob durch gute Worte, verständnisvolles Zuhören oder viele wundervolle Bergtouren, diese Momente haben mir den Antrieb nicht nur für diese Arbeit, sondern meinen bisherigen Lebensweg gegeben. Daher widme ich diese Arbeit unserer heranwachsenden Familie.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich auch an meinen Doktorvater PD Dr. Stefan Neef richten. Die Betreuung war nicht nur stets freundlich und auf Augenhöhe. Auch inhaltlich wurde ich immer sehr kompetent beraten, von der Themenauswahl über die Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur Auswertung; für die Unterstützung über viele Jahre, die Geduld und die zahlreichen Tipps möchte ich mich herzlich bedanken.

Als nächstes danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinem Bruder Alexander. Nicht nur während meines Studiums konnte ich mir immer ihrer Hilfe sicher sein.

Auch möchte ich mich hiermit herzlich bei allen Kollegen aus dem Labor bedanken, insbesondere bei Thomas, Felicia und Theresa. Ohne ihre Geduld bei unzähligen Fragen und insbesondere ohne ihre zahlreichen praktischen Tipps und Hilfen wäre diese Arbeit nicht durchführbar gewesen. Auch die immer freundliche Arbeitsatmosphäre sei hier erwähnt. Vielen Dank auch an die Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungs chirurgie (Prof. Dr. Prantl) für das freundliche zur Verfügung stellen der S2-Sicherheitswerkbank. Hierfür auch ein Dankeschön an Herrn Dr. rer. nat. Oliver Felthaus für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Natürlich möchte ich auch allen Freunden danken, welche mir während des Studiums und der Promotion immer mit Rat und Tat und gelegentlich auch mit der nötigen Ablenkung zur Seite standen.

