

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

und

dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

Über die Effekte der adenoviralen Überexpression von Proteinphosphatase Inhibitor-1 in
Herzmuskelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diana Ditz

aus Deggendorf

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 16.09.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Zimmermann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. S. Baldus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Epidemiologie, Klinik und Ätiologie	1
1.1.2	Physiologie der Herzaktion	2
1.1.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	4
1.2	Serin/Threonin-Proteinphosphatasen	7
1.2.1	Einteilung, allgemeine Funktion und Regulation der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen	7
1.2.2	Struktur der Proteinphosphatase 1	8
1.2.3	Die PP1-bindende Untereinheit am Sarkoplasmatischen Retikulum	9
1.3	Proteinphosphatase Inhibitor-1	10
1.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften und allgemeine Funktion	10
1.3.2	Regulation	12
1.3.3	Funktionen	13
1.3.4	PPI-1 im Herzen	14
1.4	Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit	15
1.5	Versuchskonzeption	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Sequenzanalyse von PPI-1 in verschiedenen Geweben	16
2.1.1	RT-PCR	16
2.1.2	PCR	16
2.1.3	Sequenzieranalyse	18
2.2	Viruskonstruktion und –vermehrung	19
2.2.1	Basenaustausch und Trunkierung von PPI-1	19
2.2.2	Virusklonierung	21
2.2.3	Virusanzucht	29
2.3	Zellkultur	35
2.3.1	Zellpräparation von Kardiomyozyten der neonatalen Ratte	35

2.3.2	Kardiomyozyten in Monolayer-Kultur	36
2.3.3	Herstellung von rekonstituiertem Herzgewebe (EHT).....	37
2.3.4	Kultivierung der EHTs	38
2.3.5	Interventionen	39
2.4	Erfassung der Kontraktionsdaten	41
2.4.1	Kontraktionsmessung.....	41
2.4.2	Datenerfassung und –verarbeitung.....	43
2.5	Erfassung biochemischer Parameter	44
2.5.1	Proteinbestimmung	44
2.5.2	Semiquantitative Erfassung bestimmter Proteine	44
2.5.3	Erfassung der mRNA-Konzentration.....	48
2.5.4	Erfassung der Serin/Threonin-Proteinphosphatase-1 Aktivität	49
2.5.5	cAMP Akkumulation	52
2.6	Immunzytochemie	54
2.6.1	Immunologische Markierung der KMNR	54
2.6.2	Quantitative Bestimmung morphologischer Parameter.....	54
2.7	Statistik.....	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Methodische Ergebnisse	56
3.1.1	Sequenzierung des kardialen PPI-1 von Mensch und Ratte.....	56
3.1.2	Herstellung der Adenoviren und die Effizienz des Gentransfers.....	58
3.2	Inhaltliche Ergebnisse	75
3.2.1	Effekte der PPI-1 Überexpression auf die Kontraktilität in EHTs	75
3.2.2	Effekte der PPI-1 Überexpression auf den Phosphorylierungszustand von Phosphoproteinen in KMNR Monolayer	81
3.2.3	Effekte auf die cAMP Akkumulation in AdEGFP/PPI-1 infizierten KMNR	89
3.2.4	Effekte auf die Zellgröße PPI-1 überexprimierender KMNR	89
3.2.5	Effekte auf die Protein- und mRNA-Konzentration PPI-1 überexprimierender KMNR	91

4	Diskussion	94
4.1	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	94
4.2	Auswahl der verwendeten Modelle	95
4.3	PPI-1 mRNA-Sequenz in verschiedenen Gewebearten.....	96
4.4	Effekte auf die Aktivität der Proteinphosphatase 1.....	97
4.4.1	Beeinflussung der Proteinphosphatase 1 durch PPI-1	97
4.4.2	Isoprenalininduzierte Effekte auf die PP-Aktivität	104
4.5	Effekte auf die kontraktile und biologische Parameter	106
4.5.1	Kontraktile Funktion	106
4.5.2	Molekulare Parameter.....	109
4.5.3	Morphologie der Kardiomyozyten	112
4.5.4	Die β -adrenerge Signalkaskade mit Einflussmöglichkeiten von PPI-1.....	113
5	Zusammenfassung	114
6	Abkürzungsverzeichnis	116
7	Literaturverzeichnis	122
8	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen	137
9	Anhang	138
9.1	Chemikalien.....	138
9.2	Hilfsmittel und Geräte.....	145
9.3	Ergebnistabellen.....	148
10	Danksagung	154
11	Lebenslauf	155
12	Erklärung	156

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Ätiologie

Seit 1990 haben die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (16,7 Millionen im Jahr 2002) die Infektionskrankheiten (15 Millionen im Jahr 2002) als führende Todesursache weltweit überholt [187; 245]. Auch in Deutschland stehen sie mit den chronisch ischämischen Herzkrankheiten (11,2%), dem akuten Myokardinfarkt (7,6%) und der Herzinsuffizienz (6,8%) an erster Stelle der Todesursachenstatistik [38]. Obwohl in den letzten Jahren die altersgruppenbezogene Mortalität durch koronare Herzerkrankungen in den entwickelten Ländern zurückgegangen ist, zeichnet sich eine steigende Anzahl von herzinsuffizienten Patienten ab [224]. Im Jahr 2002 wurden in Deutschland knapp 57.000 Todesfälle und 270.000 Entlassungsdiagnosen der Herzinsuffizienz zugeschrieben [38]. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt etwa 40-50% nach Diagnosestellung [87] und 25% nach der ersten Krankenhauseinweisung. Die Behandlung der Herzinsuffizienz kostete gut 2.700 Millionen Euro, führte zu 19.000 verlorenen Erwerbstätigkeitsjahren und zu gut 320.000 verlorenen Lebensjahren [38]. In Schottland wurde die Erstdiagnose bei 84% der Patienten nach dem 65. Lebensjahr gestellt, in dieser Altersgruppe lag die Prävalenz bei 41,9/1.000 und die Inzidenz bei 11,2/1.000 [172]. Durch die steigende Lebenserwartung und die Alterung der Bevölkerung weltweit [142] ist mit einem weiteren Anstieg ihrer Prävalenz zu rechnen [224]. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der Pathophysiologie des insuffizienten Herzmuskels und die Weiterentwicklung daraus abzuleitender neuer Therapieansätze für die Menschheit von großer Bedeutung.

Das insuffiziente Herz ist nicht mehr in der Lage, den Organismus unter normalem enddiastolischem Ventrikeldruck mit ausreichendem Blutvolumen zu versorgen. Ursache kann zum einen eine systolische Ventrikelfunktionsstörung sein, die durch eine Kontraktionsstörung des Myokards mit dadurch verringerter Auswurfleistung und meist dilatiertem Ventrikel gekennzeichnet ist. Zum anderen liegt häufig eine diastolische Ventrikelfunktionsstörung vor, die über die verminderte Dehnbarkeit zur ungenügenden Füllung des Ventrikels führt und initial häufig mit einer Ventrikelhypertrophie einhergeht. Häufig findet sich jedoch eine Kombination aus systolischer und diastolischer Funktionsstörung als Ursache für die Herzinsuffizienz. Je nach betroffener Kammer werden Links-, Rechts- und Globalinsuffizienz unterschieden. Zu den typischen klinischen Symptomen gehören Dyspnoe, Schwäche, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention, Asthma cardiale, erhöhte Herzfrequenz und Störung der kognitiven Funktion [93; 137].

Die Ätiologie der Herzinsuffizienz ist vielfältig. Am häufigsten liegen der Myokardinfarkt und inadäquat behandelte Hypertension zu Grunde [119; 120; 1]. Es kann jedoch jede Erkrankung, die mit einer längeren Überbelastung oder Schädigung des Myokards einhergeht, zur Insuffizienz desselben führen. Dazu gehören chronische Druck- oder Volumenbelastung, beides häufig durch Vitien bedingt, virale Myokarditiden, toxische Kardiomyopathien und Mutationen von Genen, die für Proteine der Sarkomere oder des Zytoskeletts kodieren [110].

1.1.2 Physiologie der Herzaktion

Das Myokard enthält neben Fasern für die reine Pumparbeit auch Fasern für die Erregungsbildung und -leitung, welche spontan Erregungen bilden können. Unter Führung des Sinusknoten als primären Schrittmacher arbeitet das Herz weitgehend autonom. Durch die Innervation seitens des vegetativen Nervensystems ist eine Anpassung an die Bedürfnisse des Gesamtorganismus möglich. Die physiologische Stimulation des Sympathikus erfolgt in Abhängigkeit von den Anforderungen des Kreislaufs und führt zur Aktivierung der β -Adrenozeptoren, die über die Steigerung der Kontraktionskraft (Inotropie), der Erregungsüberleitung (Dromotropie) und der Herzfrequenz (Chronotropie) sowie der Beschleunigung der Relaxation (Lusitropie) zur Erhöhung des Herzminutenvolumens beitragen. Demgegenüber führt eine Stimulation des Parasympathikus über den Transmitter Acetylcholin zu negativer Ino-, Chrono- und Dromotropie. Die Aktivierung von β_1 -Adrenozeptoren durch die Agonisten Noradrenalin und Adrenalin führt im Herzen über ein stimulierendes GTP-abhängiges Protein (G_s) zur Aktivierung der membranständigen Adenylylcyclase (AC), welche die Bildung des *second messengers* cyclisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) aus ATP katalysiert, der wiederum die cAMP-abhängige Protein-kinase (PKA) aktiviert [19; 153]. Da mit einem Anteil von 75-80% aller β -Adrenozeptoren der β_1 -Subtyp im Herzen dominiert und das Verhältnis α - zu β -Adrenozeptoren etwa eins zu zehn beträgt [201], resultiert die adrenerge Stimulation überwiegend in einer cAMP-Erhöhung. Die PKA phosphoryliert unter anderem den sarkolemmalen, spannungsabhängigen Calcium-Kanal (L-Typ Calcium-Kanal), den Troponin Inhibitor (TnI), das Myosin-Bindungsprotein C (MyBP-C) und Phospholamban (PLB). Diese Regulatorproteine vermitteln positive Inotropie und Lusitropie [183; 153; 73].

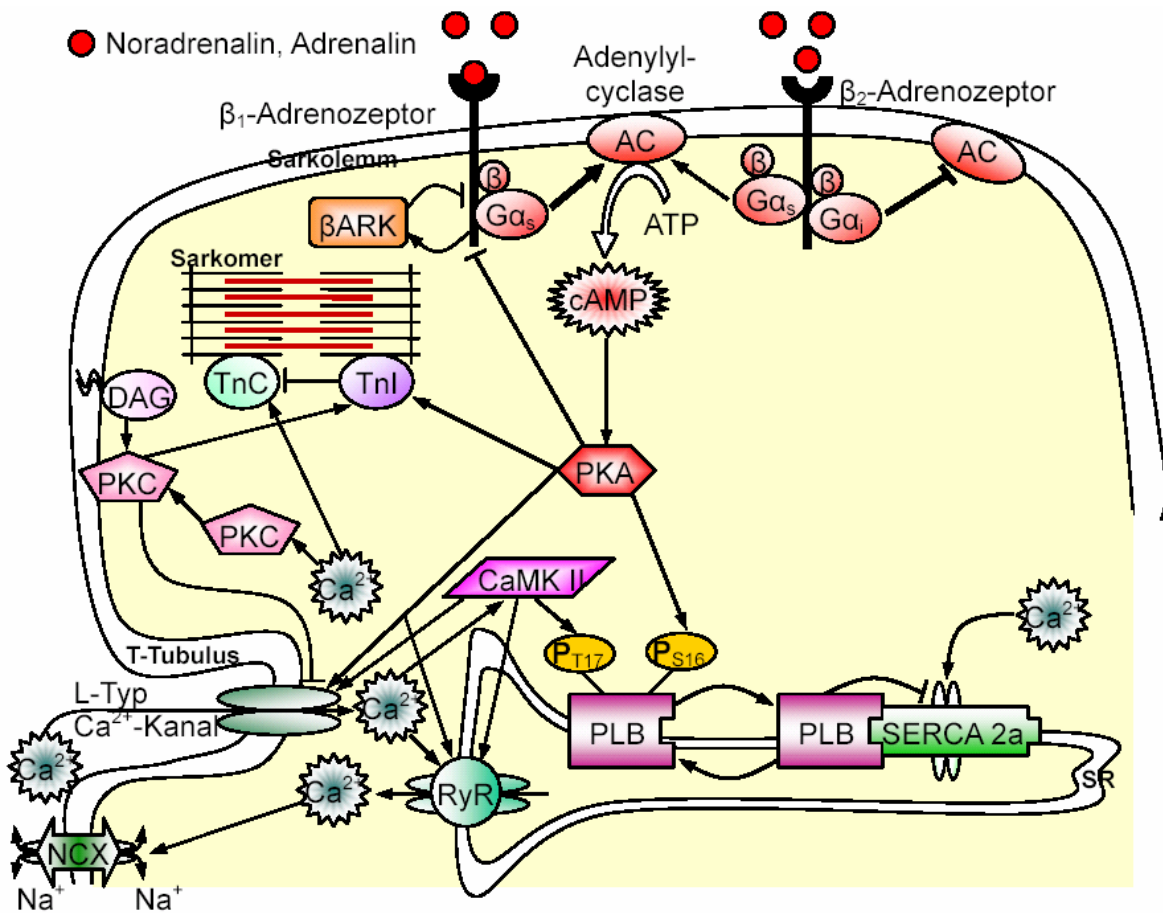


Abb. 1.1: β -Adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten.

Das Schaubild gibt einen Überblick über die β -adrenerge Signaltransduktion. Erläuterung siehe Text. β BARK entspricht der β -Adrenozeptorkinase; $G\alpha_{s/i}$, α - Untereinheit des stimulierenden/inhibierenden G-Proteins; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase; PLB, Phospholamban; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA 2a, SR-Calcium-ATPase; CaMK II, Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II; RyR, Ryanodin Rezeptor; PKC, Calciumabhängige Proteinkinase; DAG, Diacylglycerin; TnI/C, TroponinI/C; NCX, Natrium-Calcium Austauscher; P, Phosphorylierung an der angegebenen Aminosäure. Übersichten dazu bei [54; 108; 199; 134; 195; 221; 19; 20; 160; 201; 153; 159; 208; 30; 73; 140; 238; 250].

Die elektromechanische Kopplung übersetzt den elektrischen Impuls in die Kontraktion des Myokards. Während eines Aktionspotentials gelangt Calcium zunächst über den spannungsabhängigen L-Typ Calcium Kanal in die Zelle. Dieser rasche Calciumeinstrom triggert die Freisetzung von Calcium über den Ryanodin-Rezeptor aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), wo Calcium überwiegend an Calsequestrin gebunden gespeichert wird. Die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Bindung von Calcium an Troponin C in den dünnen Filamenten und ermöglicht so eine Konformationsänderung, die es den Myosinköpfchen erlaubt, an Aktin zu binden und eine Kontraktion auszuführen. Die Relaxation erfolgt über die schnelle Eliminierung des Calciums aus dem Zytosol in der Diastole. Bei Menschen und Kaninchen wird etwa 70%, bei Ratten und Mäusen 92% des Calciums über die SR Calcium-ATPase 2a (SERCA 2a) unter ATP-

Verbrauch in das SR transportiert und steht dort für die nächste Kontraktion zur Verfügung. Die restlichen 30% bzw. 8% werden durch den Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) und zu einem geringen Anteil durch langsame Calcium-ATPasen im Sarkolemm in den Extrazellulärraum befördert [20]. Die SERCA 2a wird dabei reversibel von Phospholamban, einem kleinen integralen Phosphoprotein der SR-Membran, gehemmt. Im unphosphorylierten Zustand bindet Phospholamban bei diastolischen Calcium-Konzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$ vs. $1 \mu\text{M}$ in der Systole) an die SERCA 2a und setzt deren Calcium-Affinität herab. Eine zwei- bis dreifache Steigerung der SERCA 2a-Aktivität lässt sich nach der Phosphorylierung von Phospholamban durch die PKA oder die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK II) beobachten [215; 229; 159]. Die PKA phosphoryliert Phospholamban an Serin¹⁶ und vermindert so die benötigte Calciumkonzentration für die halbmaximale Aktivierung (K_{Ca}) der SERCA2a um die Hälfte [215]. Die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration aktiviert die CaMK II [160], die ihrerseits Threonin¹⁷ phosphoryliert und dadurch die K_{Ca} weiter senkt [215]. *In vivo* wird Phospholamban nach β -adrenerger Stimulation von beiden Kinasen phosphoryliert [244; 170; 254]. Mit Hilfe von hetero- und homozygoten Phospholamban *knock out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich die Calciumaffinität der SERCA2a und die Relaxation und Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten und perfundierter Herzen linear zur Phospholambankonzentration verhalten [156]. Die homozygoten Mäuse wiesen schon basal eine starke Hyperkontraktilität auf. Die Kraft war vergleichbar mit der Kontraktionskraft von Wildtyp-Tieren unter maximaler Isoprenalinstimulation und konnte durch β -adrenerge Stimulation nicht weiter gesteigert werden [155; 156]. Dieser Phänotyp hielt bis ins hohe Alter an und ging mit einer normalen Lebenszeit einher [217]. Diese Befunde unterstreichen die Rolle von Phospholamban als Schaltstelle zwischen PKA-abhängiger Phosphorylierung und Calcium-induzierter Kontraktion. Dephosphoryliert wird Phospholamban vorwiegend durch die Proteinphosphatase-1 (PP1), aber auch durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) [158].

1.1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Das insuffiziente Herz ist nicht mehr in der Lage, eine ausreichende Menge an Blut in den Kreislauf zu pumpen. Zunächst versucht es durch adaptive Mechanismen, das Herzzeitvolumen aufrechtzuerhalten. Bei herzinsuffizienten Patienten wird eine chronische Erhöhung des Sympathikotonus beobachtet. Diese führt zur Depletion der myokardialen Speicher und erhöhten Katecholaminkonzentrationen im Blutkreislauf [111; 204]. Sie ist einer der Hauptfaktoren für die Progression der Insuffizienz und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung [59]. Die gesteigerte Plasmakatecholaminkonzentration bewirkt neben der direkten Kardiotoxizität eine selektive Vasokonstriktion mit Zentralisation des

Kreislaufs, Minderperfusion der Niere, Aktivierung der Renin-Angiotensin II-Aldosteron-Achse und führt somit zu einer vermehrten Belastung des Myokards [93].

Die ständige Okkupation des β -Adrenozeptors mit einem Agonisten ermöglicht der β -Adrenozeptorkinase-1 (β ARK), diesen zu phosphorylieren und erleichtert damit dessen Entkopplung von den nachgeschalteten GTP-abhängigen Proteinen (G-Proteine) oder die Internalisierung des Rezeptors [192]. In insuffizienten Herzen konnten eine Erhöhung der Aktivität der β -Adrenozeptorkinase-1 [235; 45; 131] sowie eine selektiv verminderte Dichte von β_1 -Adrenozeptoren nachgewiesen werden [32; 34; 235; 236]. Durch die verminderte Dichte an β_1 -Adrenozeptoren verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten der β_2 -Adrenozeptoren auf etwa 50:50 [32; 33; 36]. Die erhöhte Expression von G_i [88; 198; 85; 86] trägt zur weiteren β -adrenergen Desensitivierung bei [194]. Die Desensitivierung dient wahrscheinlich initial dem Schutz des Herzens vor den exzessiv erhöhten Katecholaminspiegeln und vermittelt möglicherweise über die β_2 -Adrenozeptoren einen antiapoptischen Effekt [194], beeinflusst aber auch den Aktivitätszustand vieler Phosphoproteine in der Herzmuskelzelle, die direkt oder indirekt den Calciumhaushalt regulieren. In Kardiomyozyten spielt Calcium als zentraler *second messenger* eine entscheidende Rolle und eine gestörte Calciumhomöostase nimmt Einfluss auf die elektromechanische Kopplung der Kontraktion [20], die Rhythmogenese [21; 193], den Zelltod [17; 194; 184] sowie die Kardiomyozytenhypertrophie [194; 18] und könnte so die Progression der Herzinsuffizienz verstärken [110; 250].

Im insuffizienten Herzen sind die Calciumtransienten kleiner und fallen langsamer ab. Die Calciumaufnahme und der -gehalt des SR sind verringert [189-191; 188]. In der Diastole wird Calcium zu langsam in das SR transportiert, dadurch bleibt die diastolische Calciumkonzentration hoch und zugleich steht im SR wenig Calcium für die nächste Kontraktion zur Verfügung. Daraus resultieren eine verminderte Relaxation und Kontraktion [167; 189; 109; 169].

Die Aktivität und die mRNA-Konzentration der SERCA 2a ist vermindert, während bezüglich des Proteingehaltes einige Gruppen keine signifikante Veränderung, andere eine Verminderung fanden (Übersicht bei [94; 110]). Phospholamban ist auf mRNA-Ebene herunterreguliert, auf Proteinebene zeigen die meisten Ergebnisse keine Veränderung [94; 159]. Allerdings wird angenommen, dass das stöchiometrische Verhältnis von Phospholamban zu SERCA 2a die regulierende Größe des SR-Calciumtransports darstellt [163; 136] und dieses ist in der Tat erhöht [163; 150; 64].

Zudem konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin¹⁶ vermindert ist [209; 211; 64; 80]. In Membranpräparaten konnte eine Ver-

dopplung der Proteinphosphatase-1 Aktivität nachgewiesen werden [176]. Die Enthemmung der SERCA 2a durch die Phospholambanphosphorylierung ist essentiell, um die Calciumhomöostase in der Zelle aufrechtzuerhalten und bei Belastung den gesteigerten Anforderungen gerecht zu werden. Die kontraktile Dysfunktion in Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten konnte durch adenovirale Überexpression von SERCA 2a normalisiert werden [65; 66]. Im Gegenzug konnte die Ablation von Phospholamban in mehreren Modellen der Herzinsuffizienz in Mäusen die Kontraktilität normalisieren [219], in einigen sogar die Entstehung der Kardiomyopathie oder die Progression zur Insuffizienz verhindern [164; 95; 207; 122]. Dies und die günstigen Langzeiteffekte [217] machten Phospholamban zu einem interessanten Ziel für neue therapeutische Ansätze. Andererseits konnte in etablierten Mausmodellen genetisch bedingter Herzinsuffizienz (Überexpression des G-Proteins G α q und Mutation des Myosin-bindenden Proteins C) der kardiomyopathische Phänotyp durch PLB-Ablation nicht verhindert oder gebessert werden [219]. Beim Menschen wurde eine Mutation in der Phospholamban-DNA gefunden, die zur Produktion eines uneffektiven, trunkierten Proteins führt. Bei Heterozygoten führte sie zu einer Herzhypertrophie ohne Einschränkung der Kontraktilität. Homozygote Familienmitglieder indes entwickelten eine, schon im jugendlichen Alter letale, dilatative Kardiomyopathie [107], so dass die Eignung des kleinen Proteins durch seine Inhibition zur Therapie der Herzinsuffizienz beizutragen - zumindest beim Menschen - wieder sehr in Frage gestellt ist.

1.2 Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist einer der wichtigsten Mechanismen zur Kontrolle intrazellulärer Signaltransduktion. Etwa ein Drittel aller zellulären Proteine enthält kovalent gebundenes Phosphat. Der Phosphorylierungsgrad reflektiert dabei die relative Aktivität der phosphorylierenden Proteinkinasen und der dephosphorylierenden Proteinphosphatasen. Obwohl Proteinkinasen schon seit langem Gegenstand intensiver Forschung sind, wurde den Proteinphosphatasen erst in letzter Zeit vergleichbare Aufmerksamkeit geschenkt [130].

1.2.1 Einteilung, allgemeine Funktion und Regulation der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1c) gehört zu den Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (PP). Traditionell wurden die PPs nach ihrer Substratspezifität und Abhängigkeit von verschiedenen Ionen eingeteilt. Die PP1 weist eine höhere Spezifität gegenüber der β -Untereinheit der Phosphorylase Kinase auf und ist durch die Proteinphosphatase Inhibitoren-1 und -2 (PPI-1 und -2) hemmbar. Die Typ 2 PPs weisen eine höhere Spezifität gegenüber der α -Untereinheit auf und sind nicht durch die Inhibitoren-1 und -2 beeinflussbar. Die Typ 2 PPs werden nach ihrer Abhängigkeit von Kationen weiter unterteilt in die unabhängige PP2A, die calciumabhängige PP2B – auch Calcineurin genannt – und in die magnesiumabhängige PP2C [132]. Die Zuordnung zu Genfamilien erfolgt auf Grund der Aminosäuresequenzen und der Kristallstruktur. PP1, PP2A und PP2B zählen zur PPP Familie [56] und weisen 40-50% Ähnlichkeit auf [58; 100]. Mehr als zehn neue PPs der PPP Familie konnten isoliert werden [44]. In Säugetieren kodieren drei verschiedene Gene PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ [55; 72; 206] sowie beim Menschen eine zusätzliche PP1 α -Variante, PP1 α_2 [77; 251], für die PP1c. Die PP1c ist ein während der Evolution außerordentlich gut konserviertes Enzym [42] und die Isoformen zeigen fast 90% Identität in ihrer Aminosäuresequenz mit Divergenzen nur am C- und N-terminalen Ende [10; 57]. Multiple zelluläre Prozesse werden durch die ubiquitär vorkommende PP1 reguliert. Sie fördert die Wiederverwertung von Proteinen, Transkriptions- und Spliceprodukten, das Zurücksetzen auf Energiesparmodus, das Anlegen von Glykogenspeichern und die Relaxation des Zytoskeletts und Aktomyosins. Außerdem unterstützt PP1 die Erholung von Stresssituationen oder bei starkem Zellschaden die Apoptose und nimmt an der Regulation des Zellzyklus und des Membranpotentials aller erregbaren Membranen teil [117; 43]. Die hohe Substratspezifität gegenüber einer Vielzahl an Proteinen wird durch regulatorische Untereinheiten vermittelt, welche die PP1c an subzelluläre Kompartimente oder an das Substrat binden [129; 57] und die Spezifität ge-

genüber dem favorisierten Protein erhöhen, gegenüber anderen hingegen erniedrigen [2]. Zu den endogenen Inhibitoren gehören unter anderem der Proteinphosphatase Inhibitor-1 (PPI-1) mit dessen Strukturhomolog DARPP-32, das Dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa sowie PPI-2 [54; 214; 57]. PP1 kann auch durch die exogenen Inhibitoren Okadasäure, Cantharidin, Calyculin A und Microcystin LR inhibiert werden [117].

1.2.2 Struktur der Proteinphosphatase 1

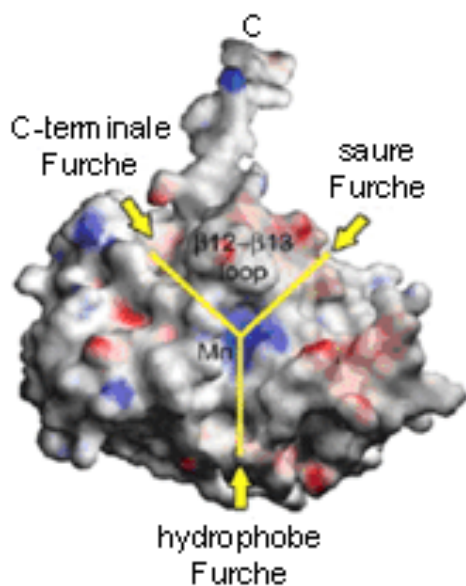


Abb. 1.2: Elektrostatische Oberfläche der Proteinphosphatase 1.

PP1 ist ein kleines, kompaktes, elliptisches Protein von 37 kDa, mit drei Furchen in Form eines Y, welche die Oberfläche prägen und in deren Kreuzungspunkt die katalytische Region mit zwei Metallionen – Mangan und Eisen – liegt. Die β 12- β 13-Schleife repräsentiert eine wichtige Bindungsstelle für Inhibitoren und Toxine. Die roten Regionen entsprechen negativ, die blauen positiv geladenen Aminosäureresten. Entnommen aus [231].

Die PP1c (s. Abb. 1.2) imponiert als kompaktes, elliptisches Protein, dessen katalytische Region an der Kreuzungsstelle von drei Furchen liegt - eine saure, C-terminale und hydrophobe - welche die Oberfläche prägen. In der katalytischen Region sind zwei Metallionen, Eisen und Mangan, gebunden [78; 100; 231]. Die Dephosphorylierung erfolgt durch den nukleophilen Angriff eines durch die Metallionen aktivierten Wassermoleküls auf das Phosphat des Substrats [78; 100; 9]. Zwischen der C-terminalen und der sauren Furche erhebt sich eine kleine Protrusion, die so genannte β 12- β 13-Schleife, die für die Interaktion mit Inhibitoren und Toxinen wichtig ist [62; 242]. Im Gegensatz zu den nahezu identischen Isoformen der PP1c, weisen die wenigsten regulatorischen Untereinheiten Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz auf [57] und dennoch schließt sich die Bindung mehrerer gegenseitig aus [9; 2]. Als Konsensussequenz wurde eine Folge von 4-5 Aminosäuren identifiziert, unter denen das RVxF-Motiv das häufigste ist, und die distal der katalytischen Region in einer hydrophoben Tasche der C-terminalen Region von PP1c binden. Die allgemeine Konsensussequenz für das PP1c-Bindungsmotiv ist Lysin/Arginin- x_1 -Valin/Isoleucin- x_2 -Phenylalanin/Tryptophan, wobei x_1 fehlt oder wie auch x_2 jede Aminosäure ohne

große hydrophobe Reste sein kann [79; 2]. Strukturanalysen zeigen, dass Valin/Isoleucin und Phenylalanin/Tryptophan hierbei die wichtigste Rolle spielen, da bei einer Mutation von Valin keine und von Phenylalanin eine stark reduzierte Bindung erfolgt [79].

1.2.3 Die PP1-bindende Untereinheit am Sarkoplasmatischen Retikulum

Die 160 kDa schwere, lokalisierende Untereinheit G_M bindet die 37 kDa leichte PP1c in der quergestreiften Muskulatur an Glykogen [225; 230] und an die transmembranäre Domäne von Phospholamban im Sarkoplasmatischen Retikulum [16]. Für die glykogenbindende G_M wurde gezeigt, dass eine PKA-abhängige Phosphorylierung an Serin⁴⁸ die Phosphorylierung an Serin⁶⁷ erleichtert [118; 128; 240], welches im RVxF-Bindungsmotiv liegt [79] und zur Dissoziation der beiden Untereinheiten führt. Die Aktivität der freien PP1c ist im Zytosol geringer [127] und kann dort zudem durch Bindung des PKA-aktivierten PPI-1 gehemmt werden [54]. Gegen einen derartigen Mechanismus im kardialen Sarkoplasmatischen Retikulum spricht die fehlende Freisetzung von PP1c in PKA-phosphorylierten Membranvesikeln [104]. Des Weiteren wurde die Überexpression der PP1c zwar von einer adäquaten PLB-Dephosphorylierung, nicht aber von einem Anstieg der G_M begleitet [41], so dass der Verdacht nahe liegt, dass noch andere lokalisierende Untereinheiten oder Mechanismen der Kompartimentierung im Herzen vorliegen.

Etwa 90% der phospholambanassoziierten PP-Aktivität werden im Herz der PP1c zugesprochen [158; 220], die in der Herzinsuffizienz bei Menschen [176] und in Tiermodellen [165; 105] erhöht ist. Die dreifache Überexpression von PP1c_α in Mäuseherzen zeigt einige Charakteristika, die der menschlichen Herzinsuffizienz sehr ähnlich sind, unter anderem eine biventrikuläre Dilatation, intrakardiale Thromben, interstitielle Fibrose, Hypertrophie der Kardiomyozyten, verringerte Kontraktilität und β -adrenerge Antwort sowie eine erhöhte Mortalität. Damit einhergehend wurden eine verminderte SERCA 2a Konzentration und eine erheblich reduzierte Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung gefunden [41]. Die Dysregulation des Calcium Transportes im Sarkoplasmatischen Retikulum trägt nicht nur zur verminderten Kontraktilität, sondern durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration auch zur Induktion und Progression der kardialen Hypertrophie bei [194; 110]. Somit kann angenommen werden, dass bei diesem Prozess die PP1 eine wichtige Rolle einnimmt [41].

1.3 Proteinphosphatase Inhibitor-1

1.3.1 **Physikalisch-chemische Eigenschaften und allgemeine Funktion**

Der Proteinphosphatase Inhibitor-1 (PPI-1) wurde erstmals 1976 als Phosphorylase Phosphatase Inhibitor in der Skelettmuskulatur von Kaninchen beschrieben [123]. Als hochspezifischer PP1 Hemmer wird PPI-1 im Zytosol [133] verschiedener Gewebe von Säugtieren exprimiert und ist an der Regulation des Glykogenmetabolismus, der synaptischen Plastizität, des Zellwachstums und der Muskelkontraktion beteiligt [182]. Die höchsten Konzentrationen bei Säugetieren wurden im Gehirn, Skelettmuskel, Fettgewebe und den Nieren vorgefunden [157; 106; 114; 8; 154], doch auch im Herz wird PPI-1 exprimiert [175; 103]. Das, bei Kaninchen aus 165 Aminosäuren bestehende, Protein (s. Abb. 1.3) mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 18.640 Dalton [4], verhält sich extrem stabil gegenüber den Einwirkungen von Hitze, Säure, organischen Lösungsmitteln und Detergenzien, labil nur gegenüber der Proteinase Trypsin [123; 178; 91]. In der Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) findet sich die Bande bei 26 kDa [178]. Diese Differenz ist wahrscheinlich auf die geringe Detergenzienbindung [4], die eher randomisiert-spiralige Form des Proteins und einen großen Stoke'schen Radius [53] zurückzuführen.

	10	20	30	40	50	60
Mensch	MEQD NSPRKI	QFTVPLLEPH	LDPEAAEQIR	RRRP TPATLV	LTSDQSSPEI	DED RIPNPHL
Ratte	** p*****	*****	*****	*****	*****V	*****L*
Kanin.	** *****	*****	*****	*****	*****V	*****L*
	70	80	90	100	110	120
Mensch	KSTLAMSPRQ	RKKMTRITPT	MKELQMMVEH	HLGQQQGGEE	PEGAAESTGT	QESRPPGIPD
Ratte	***S****	*****T**	*****T**	*****K****	*****T****N	***C*****
Kanin.	*PS*****	*****T**	*****	*****E****	*****G**A	**Q***T**G
	130	140	150	160	170	
Mensch	TEVESRLGTS	G TAKKTAECI	PKTHERGSKE	PSTKEPSTHI	PFLDSKGANS	V
Ratte	*GSA** PD**	**Q*P**K	***Q*QRGV*	***EDL*A*M	L***Q** SL	*
Kanin.	*GA****P*	A**Q*P*QPS	*RAQ**RGE*	***AKT*Q.-	...*Q**SA	*

Abb. 1.3: Proteinsequenz von PPI-1 verschiedener Spezies.

Die Primärstruktur von PPI-1 aus dem menschlichen Gehirn und der Skelettmuskulatur von Ratte und Kaninchen ergaben ein 171/165 Aminosäuren umfassendes Protein. Das KIQF-Motiv, Threonin³⁵ und Serin⁶⁷ sind hervorgehoben und die fast vollständige Übereinstimmung der N-terminalen 61 Aminosäuren ist gut zu erkennen. *Accession numbers* Q13522, P19103, P01099.

Die Primärstruktur des PPI-1 aus der Skelettmuskulatur von Ratten (s. Abb. 1.3) ist mit 171 Aminosäuren etwas länger als bei Kaninchen. Dementsprechend erhöht sich das kalkulierte Molekulargewicht auf 18.737 Da [82] und die Bande in der Gelelektrophorese migriert bei 30 kDa [157]. Dennoch sind 80% der gesamten Sequenz und sogar 98% der N-terminalen 61 Aminosäuren identisch [82]. Die N-terminalen 54-66 Aminosäuren verkörpern die kürzeste, aktive Untereinheit des PPI-1 der Ratte, des Kaninchens und des Men-

schen [4; 82; 83]. Darin liegt das PP1 Bindungsmotiv ${}^9\text{Lys-Ile-Gln-Phe}^{12}$ [100; 79] und Threonin³⁵, welches PKA-abhängig phosphoryliert wird und so PPI-1 aktiviert [51]. Untersuchungen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie zeigten, dass die Sekundärstruktur des Proteins kaum geordnet ist und nach Phosphorylierung durch PKA keine Konformationsänderung stattfindet. PP1c bindet sowohl an Threonin³⁵ phosphoryliertes als auch dephosphoryliertes PPI-1, allerdings dissoziiert nicht-phosphoryliertes PPI-1 doppelt so schnell wieder ab. Die Spezifität ist zum einen bedingt durch die Differenz der benötigten Inhibitor-Konzentration zur halbmaximalen Hemmung (IC_{50}) der PP, die bei PP1 1 nM und bei PP2A 25 μM Phosphothreonin³⁵-PPI-1 beträgt [83], zum anderen dissoziiert PPI-1 von PP2A 40-90 mal schneller ab als von PP1 [83]. Die höchste gemessene Gewebekonzentration von PPI-1 beträgt 1,5 μM in der Skelettmuskulatur von Kaninchen [178], so dass die Hemmung der PP2A *in vivo* wohl nicht vorkommt.

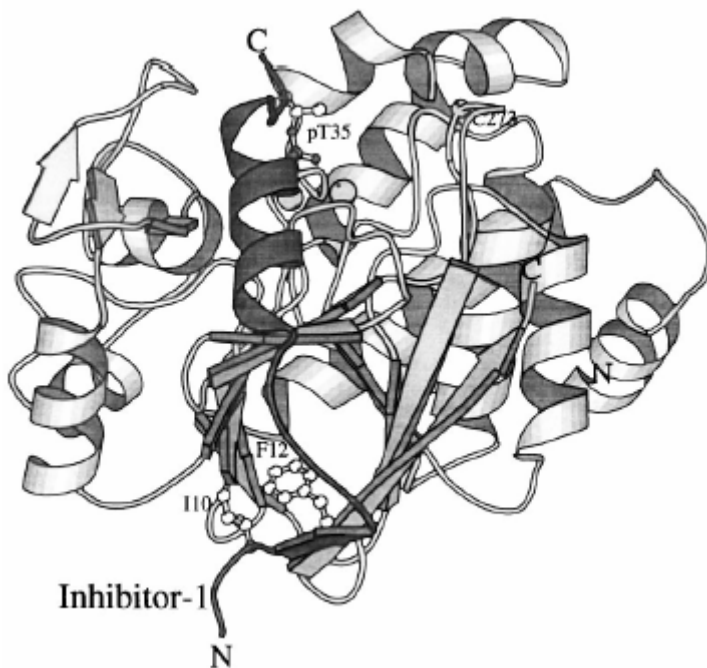


Abb. 1.4: Komplex der Aminosäuren 8-38 des Phosphothreonin³⁵-PPI-1 mit PP1c.

Der N-terminale Anteil des PPI-1 ist dunkler dargestellt. Isoleucin¹⁰ und Phenylalanin¹² im β -Faltblatt interagieren mit dem RVxF-Bindungsmotiv der PP1c, während sich Phosphothreonin der katalytischen Region entgegenstreckt, um diese zu blockieren. Abbildung entnommen aus [9].

Bei der Interaktion von PPI-1 mit PP1c (s. Abb. 1.4) vermittelt ${}^9\text{Lys-Ile-Gln-Phe}^{12}$ als β -Faltblatt die Bindung an die PP1c, während die vier Arginin vor Threonin³⁵ mit Aminosäureresten der sauren Furche der PP1c in Beziehung treten und die Phosphatgruppe des Threonin³⁵ die Phosphatbindungsstelle der katalytischen Region okkupiert [100; 9]. Als essentiell wichtig für die spezifische und potente Inhibition verbleiben seitens der PP1c die β 12- β 13-Schlinge, darin insbesondere Tyrosin²⁷² [61; 242], und von Seiten des PPI-1 Phosphothreonin³⁵ sowie das ${}^9\text{KIQF}^{12}$ -Motiv, darin vor allem Isoleucin¹⁰ [214; 83].

1.3.2 Regulation

PPI-1 wird *in vivo* nach β -adrenerger Stimulation [91; 92; 141] durch die Aktivierung der β_1 -Adrenozeptoren, G_s und der Adenylcyclase mit folgender cAMP-Erhöhung und PKA-Aktivierung [221; 208; 248] an Threonin³⁵ phosphoryliert [4]. *In vitro* Experimente zeigten, dass PPI-1 an Threonin³⁵ ebenfalls zeitabhängig, jedoch langsamer auch von der cGMP-abhängigen Proteinkinase (28 vs. 102 nmol Phosphat/min/ μ g PPI-1 durch die PKA) phosphoryliert wird. Beide Proteinkinasen erreichen einen maximalen Einbau von etwa 0,75-1 Mol Phosphat/Mol PPI-1 [83; 232]. *In vivo* wird Threonin³⁵ in der quergestreiften Muskulatur des Kaninchens hauptsächlich dephosphoryliert, Serin⁶⁷ hingegen mit einer Stöchiometrie von 0,5-0,7 Mol Phosphat/Mol PPI-1 phosphoryliert vorgefunden [4]. Die Bedeutung der Serin⁶⁷ Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert. Zum einen wurde in Rindergehirnextrakten gezeigt, dass an Serin⁶⁷ phosphoryliertes PPI-1 die PP1 hemmt und die benötigte Inhibitorkonzentration zur halbmaximalen Hemmung der PP1 (IC_{50}) vergleichbar mit der IC_{50} des PKA-phosphorylierten PPI-1 ist, wobei eine Phosphorylierung von beiden Kinasen einen geringfügig additiven Effekt auf die IC_{50} ausübt [125]. In anderen Untersuchungen konnte im Vergleich zu Phosphothreonin³⁵-PPI-1 das an Threonin³⁵ und Serin⁶⁷ phosphorylierte Protein keine signifikante Veränderung in der PP1-Inhibitionskinetik zeigen, allenfalls schien es modulierende Einflüsse auf die Aktivierung von PPI-1 zu haben. Hierbei wurde eine *in vitro* Phosphorylierung von Serin⁶⁷ durch mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK, hier insbesondere ERK1 und MEK2E) und die Cyclin abhängigen Kinasen 1 und 5 (Cdk1 und 5) gezeigt und die Relevanz der Cdk5-abhängigen Phosphorylierung *in vivo* im Striatum untermauert [24]. Ähnliche Mechanismen der Feinregulation wurden auch bei dem Strukturhomolog DARPP-32 gefunden [98; 68-70; 23; 102]. Braz et al. beobachteten nun kürzlich bei der Charakterisierung zweier Mausmodelle, bei denen die calciumabhängige Proteinkinase α (PKC α) entweder deletiert oder überexprimiert wurde, eine verbesserte bzw. verschlechterte kardiale Funktion. Auf der Suche nach der Ursache fanden sie Phospholamban in den *knock out* Mäusen vermindert vor. Die Phospholamban-Serin¹⁶-Phosphorylierung verhielt sich gegenläufig, so dass das Verhältnis von phosphoryliertem Phospholamban zur Gesamtmenge des Proteins in den *knock out* Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen etwa dreifach erhöht war. Während die PP2A-Aktivität unverändert blieb, wiesen die *knock out* Mäuse eine um ein Drittel erniedrigte PP1-Aktivität gegenüber Wildtypmäusen auf. Sie konnten dann zeigen, dass die Interaktion zwischen PP1c und PPI-1 in Kardiomyozyten, die dominant-negative PKC α überexprimieren um 70% erhöht ist. PKC α übte keinerlei Einfluss auf die Threonin³⁵-Phosphorylierung von PPI-1 aus. Sie konnten jedoch zeigen, dass in den *knock out* Mäusen die Serin⁶⁷-Phosphorylierung um über die Hälfte reduziert ist. Weitere Experimente gaben Anlass zur An-

nahme, dass PPI-1 an Serin⁶⁷ und an noch einer oder mehreren anderen Aminosäureresten PKC-abhängig phosphoryliert wird. Hierbei führt die Phosphorylierung einer dieser Aminosäuren zur Hemmung der PPI-1-vermittelten Inhibition der PP1 [30]. Dephosphoryliert wird PPI-1 *in vitro* von PP2A und PP2B, wobei *in vivo* bei erhöhter freier Calciumkonzentration die PP2B dominiert [54; 212; 28; 213; 24; 81].

1.3.3 Funktionen

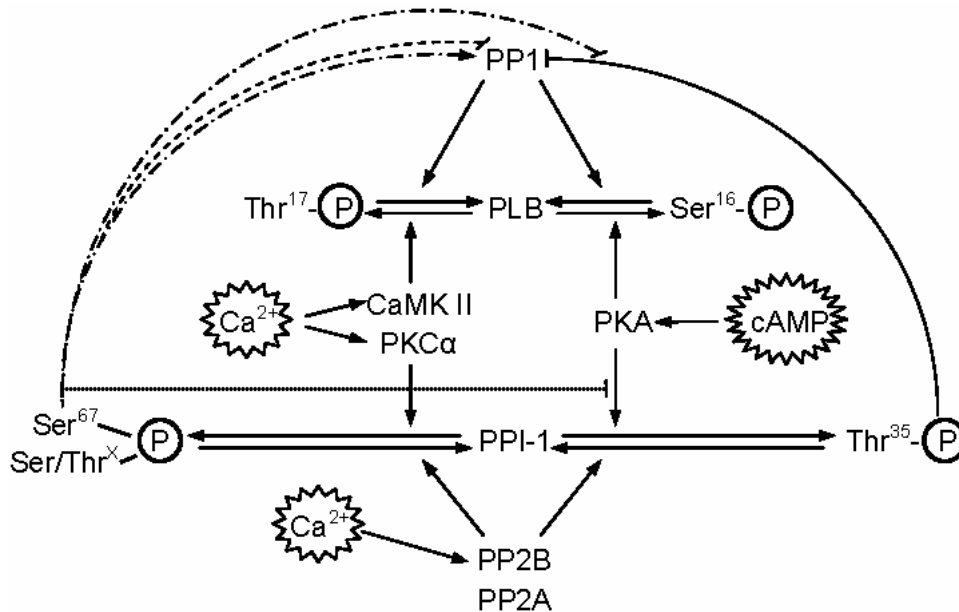


Abb. 1.5: Regulation von PPI-1 und Phospholamban (PLB).

Die Abbildung gibt eine Übersicht über die direkte Aktivierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die Phosphorylierung durch die calciumabhängige Proteinkinase (PKC) und die Dephosphorylierung seitens der Proteinphosphatasen 2A und 2B (PP2A und PP2B) des PPI-1, sowie deren Auswirkungen auf die Proteinphosphatase 1 (PP1) und Phospholamban (PLB). P steht dabei für die Phosphorylierung der angegebenen Aminosäure, die gestrichelten Linien entsprechen postulierten, aber nicht hinreichend verifizierten Einflussmöglichkeiten. Außerdem wird die Vernetzung Calcium- (Ca²⁺) und cAMP-abhängiger Signaltransduktionswege deutlich.

Nach der Entdeckung von PPI-1 als Phosphorylase Phosphatase Inhibitor wurde seine Rolle im Glykogenmetabolismus erforscht. Die Hemmung der PP1 erhöht dabei den Glykogenabbau und vermindert dessen Synthese. PPI-1 wird hier von Adrenalin aktiviert und von Insulin deaktiviert [91; 92]. Die physiologische Relevanz dieser Daten wurde bisher jedoch nicht eruiert [182]. Eine weitere wichtige Rolle übernimmt PPI-1 im Gehirn bei der Langzeitdepression (LTD) der Aktivität von Neuronen, die der Lernfähigkeit und Gedächtnisleistung zu Grunde liegen. Hier wird PPI-1 von Calcineurin dephosphoryliert und dadurch die PP1-Aktivität erhöht, die die LTD generiert [168]. Auch in der glatten Muskulatur von Arterien, deren Calciumsensitivität von PPs reguliert wird, wurde PPI-1 entdeckt. In einem PPI-1 *knock out* Mausmodell konnte aber kein Einfluss von Seiten des

PPI-1 dargestellt werden, lediglich in der Portalvene zeigte sich eine Desensitivierung der isoprenalininduzierten Relaxation in den *knock out* Tieren [40]. Neumann et al. fanden erstmalig direkte Hinweise, dass PPI-1 *in vivo* im Herzen isoprenalinabhängig aktiviert wird und die PP1 hemmt [175].

1.3.4 PPI-1 im Herzen

In Rattenherzen wurde die Inhibition der PLB-Dephosphorylierung nach Zugabe exogener PP1 durch Phosphothreonin³⁵-PP1-1 gezeigt [133]. In Saponin behandelten Kaninchenkardiomyozyten wurde eine dosisabhängige positive Korrelation zwischen der Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung, der SR-Calciumaufnahme und der PP1-Inhibition [15] beschrieben. Die Untersuchung von PPI-1 *knock out* Mäusen durch Carr et al. brachte weitere wichtige Erkenntnisse [41]. So wurden die basalen Kontraktionsparameter *in vivo* supprimiert vorgefunden, vergleichbar mit denen dreifach PP1c-überexprimierender transgener Mäuse. In den perfundierten Herzen zeigte sich eine signifikante Verringerung der maximalen Kontraktions- und Relaxationsrate nach Isoprenalinstimulation im Vergleich zu Wildtypmäusen. Der cAMP-Gehalt, sowie die Konzentration von SERCA 2a und Phospholamban stellten sich unverändert dar, während die PP1-Aktivität erhöht und die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin¹⁶ um ein Viertel, die an Threonin¹⁷ um die Hälfte verringert war. Es konnte kein Einfluss auf die L-Typ Calciumkanal Aktivität und Dichte oder die Troponin I Phosphorylierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PP1 transgenen Mäusen entwickelten die PPI-1 *knock out* Mäuse hingegen auch nach 15 Monaten keinerlei Anzeichen einer Herzhypertrophie oder anderer Faktoren, die für eine Progression zur Herzinsuffizienz sprechen würden [41]. Desweiteren wurde in Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten durch adenoviralen Gentransfer eine konstitutiv aktive PPI-1_{T35D} Mutante [83] überexprimiert. Damit gelang es durch signifikant gesteigerte Zellverkürzung, erhöhte Frequenz von Kontraktion und Relaxation, verringerter Zeitkonstante τ für die Relaxation und einen Abfall des Calciumsignals die bei Herzinsuffizienz verminderte Isoprenalinantwort wieder zu verstärken [41].

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von PPI-1 im Herzen besser zu charakterisieren. Hierzu sollten die Auswirkungen einer PPI-1 Überexpression zum einen auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten sowie zum anderen auf den Phosphorylieungszustand verschiedener Phosphoproteine untersucht werden, um zu einem besseren Verständnis der Signaltransduktionswege im Zusammenhang mit PPI-1 zu führen. Hierzu wurde zunächst der adenovirale Gentransfer in rekonstituiertem Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) etabliert.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Der Protein Phosphatase Inhibitor-1 (PPI-1) wurde bereits vor über 30 Jahren entdeckt. Dennoch sind Funktion und Relevanz dieses Proteins *in vivo* bisher nur wenig untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Überexpression von PPI-1 in Kardiomyozyten neugeborener Ratten (KMNR) in Monolayerkultur und rekonstituiertem Herzgewebe auf deren Kontraktilität zu charakterisieren.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Unter welchen Bedingungen wird ein optimaler adenoviraler Gentransfer in *engineered heart tissue* (EHT) erreicht?
2. Beeinflusst Überexpression von PPI-1 die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten?
3. Welche Phosphoproteine sind dadurch in ihrem Phosphorylierungszustand verändert?
4. Beeinflusst die PPI-1-Überexpression die Konzentration von cAMP oder der G-Proteine im Sinne einer negativen Rückkopplung?

1.5 Versuchskonzeption

Zunächst wurde die mRNA von PPI-1 aus Herzmuskelgewebe von Ratten in cDNA umgeschrieben und sequenziert. Mit dieser Sequenz sowie mit einem trunkierten, konstitutiv aktivem Fragment wurden Adenoviren generiert und die Effektivität der adenoviralen Überexpression in Kardiomyozyten neugeborener Ratten eingehend überprüft. Nach Etablierung des adenoviralen Gentransfers in rekonstituiertem Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) wurden die Einflüsse der adenoviralen PPI-1 Überexpression auf die kontraktile Funktion an EHTs unter steigenden Calcium- und Isoprenalinkonzentrationen im Organbad untersucht. Die Erfassung des Phosphorylierungsgrades von Phospholamban und der mitogen aktivierten Proteinkinase p38, sowie der Konzentration der GTP-bindenden Proteine und der cAMP-Akkumulation erfolgte in kultivierten Kardiomyozyten.

2 Material und Methoden

Soweit nicht bereits im Text erwähnt sind alle verwendeten Materialien im Anhang tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Sequenzanalyse von PPI-1 in verschiedenen Geweben

Zur Erfassung der Sequenz des PPI-1 in Herzen „gesunder“ Spender, als auch herzinsuffizienter (NYHA III-IV) Patienten sowie im Herz- und im Skelettmuskel der Ratte, wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit reverser Transkriptase (RT-PCR) und entsprechender RNA (Präparation siehe Kapitel 2.5.3) durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde in einer PCR mit DNA Polymerase vermehrt und sequenziert, die Sequenzen miteinander verglichen.

2.1.1 RT-PCR

Für die RT-PCR wurden je Probe 8 µg RNA in *Aqua ad iniectabilia* und 4 µl Random Primer (p(dN)₆) für 5 min bei 94 °C denaturiert. Nach Zugabe des Reaktionsmix erfolgte die Inkubation für 50 min bei 42 °C und anschließend die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 94 °C für 5 min.

Reaktionsmix

5x First Strand buffer	16 µl
dNTP-Mix (10 mmol/l)	8 µl
DTT (100 mmol/l)	4 µl
M-MLV reverse Transkriptase	4 µl

2.1.2 PCR

Die Amplifikation der spezifischen cDNA mit anschließender Sequenzieranalyse erfolgte mit folgendem Ansatz, Temperaturbedingungen (Tabelle 2.1) und Primern (Tabelle 2.2).

PCR Reaktionsansatz

10-facher PCR Puffer II	10 µl
MgCl ₂ (25 mmol)	12 µl
dNTP	2 µl
Primer, vorwärts (100 pM)	2 µl
Primer, rückwärts (100 pM)	2 µl
RT-Produkt	4 µl
DNA Polymerase	0,5 µl

ad 100 µl *Aqua ad iniectabilia*.

Tabelle 2.1: PCR Temperaturbedingungen für GeneAmp® PCR System 9700

Amplifizierungs PCR	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	94	10 min	1
Denaturierung	94	30 sek	40
Annealing	58	45 sek	40
Synthese	72	1 min	40
Extinktion	72	10 min	1

Tabelle 2.2: Liste verwendeter Primer

Primer	Sequenz
Ratte PPI-1, vorwärts mit EcoRI	5' aag ctt gaa ttc gag ccc gac aac agt cca 3'
Ratte PPI-1, rückwärts mit EcoRI	5' cgc aga att ctc aga cca agc tgg ctc ctt g 3'
Mensch PPI-1, vorwärts	5' gcc atg gag caa gac aac a 3'
Mensch PPI-1, rückwärts	5' cct ctc tca gac cga gtt gg 3'

Die amplifizierte PPI-1 DNA wurde über ein präparatives Agarose-Gel separiert. Zur DNA-Probe wurden 20% DNA Ladepuffer gegeben und der gesamte Ansatz neben einem Größenstandard auf ein 0,5%iges DNA-Agarosegel mit präparativem Kamm geladen. Das Gel wurde mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-(Tris)-Azetat-EDTA-Laufpuffer (TAE) in Elektrophorese-Kammern unter Spannung gelegt. Die Laufzeit betrug bei 55 V 1-1,5 h.

Tris-Azetat-EDTA (TAE) Puffer :

Tris	4,84 g
Na ₂ EDTA · (H ₂ O) ₂	0,744 g
Azetat	1142 µl

ad 1 l *Aqua ad iniectionabilia*,

pH = 8,5 eingestellt.

DNA Ladepuffer :

Bromphenolblau	50 mg
Xylencyanol	25 mg
Glycerin	37,8 g

ad 100 ml *Aqua destillata*Ethidiumbromid Stammlösung:

10 mg Ethidiumbromid in 1 ml *Aqua ad iniectionabilia* lösen und zum Gebrauch 1:10 verdünnen. Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaften ist Ethidiumbromid ein starkes Mutagen und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen sind im Umgang damit, sowie bei der Entsorgung kontaminierter Lösungen und Gegenstände zu treffen.

0,5% DNA-Agarosegel:

Ein Gemisch aus 0,25 g *small* DNA Agarose und 0,25 g Universal Agarose wurde in 100 ml TAE aufgekocht, unter rühren abgekühlt und 20 µl verdünnte Ethidiumbromid-Lösung zugeben. Anschließend wurde die Lösung blasenfrei in einen Gelhalter mit Probenkamm gegossen und 20-30 min zum Aushärten in den Abzug gestellt.

Sobald die entsprechende Bande deutlich von den Primern getrennt war, wurde sie am UV-Transluminator ausgeschnitten und die DNA mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit eluiert.

2.1.3 Sequenzieranalyse

Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurde eine PCR mit einem Sequenzierkit durchgeführt und die DNA anschließend gefällt. Die Sequenzierung wurde im Institut für Biochemie der Universität Erlangen durchgeführt.

Es wurden auf Eis 200-1000 ng DNA ad 15 µl *Aqua ad iniectabilia*, 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 4 µl Sequenziermix gemischt. Die Primersequenzen, wiederum für jede Probe je einen vorwärts (for.) und rückwärts (rev.) laufenden Primer, sind obiger Tabelle zu entnehmen. Die Ansätze wurden mit Silikonöl überschichtet und mit folgendem Temperaturschema amplifiziert.

Tabelle 2.3: Temperaturbedingungen für die Sequenzierungs-PCR im PE 9600

Sequenzierungs PCR	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	30 sek	25
Annealing	50	15 sek	25
Synthese	60	1 min	25
Extinktion	60	10 min	1

Nach der Amplifikation wurde der Ansatz gereinigt. Hierzu wurden zu je 20 µl PCR Produkt 2 µl einer 1,5 M NaAc/250 mM EDTA Lösung, 1 µl Glykogen und 60 µl absoluter Ethanol gegeben und das Gemisch 15 min auf Eis präzipitiert. Die Ansätze wurden bei 4 °C und 20.800 g für 30 min zentrifugiert (Centrifuge 5417 R) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt oder sofort zur Sequenzierung weitergegeben.

2.2 Viruskonstruktion und –vermehrung

2.2.1 Basenaustausch und Trunkierung von PPI-1

Zur Konstruktion des konstitutiv aktiven PPI-1_(-1-65, T35D) erfolgte zunächst der Basenaustausch T35D und anschließend die Trunkierung mit Abspaltung der N-terminalen 195 kodierenden Basen mittels PCR.

2.2.1.1 Sequenzaustausch

Durch den Austausch von Adenin und Cytosin an Position 103 und 104 durch Guanin und Adenin wird später an Stelle von Threonin³⁵ Aspartat³⁵ in PPI-1 eingebaut. Hierzu wurden zwei PCR-Ansätze, einer mit 5' gcc gcc ccg acc ctg cc 3' als vorwärtslaufender Primer, der den Basenaustausch kodiert, und 5' (ct) (ct)t cta gat cag acc aag ctg gct cc 3' als rückwärtslaufender Primer mit Xba I (5' t/ctaga 3') als C-terminale Schnittstelle für das C-terminale DNA-Fragment und ein Ansatz mit 5' (ac) (ac) (ac) ggt acc gcc atg gag ccc gac aac 3' als vorwärtslaufender Primer mit Kpn I (5' ggtac/c 3') als N-terminale Schnittstelle und 5' ggc agg gtc ggg gcg gc 3' als rückwärtslaufender Primer, der den Basenaustausch für das N-terminale DNA-Fragment kodiert, gemäß Tabelle 2.4 amplifiziert (Vgl. Abb. 2.1 A).

PCR Reaktionsansatz:

10facher PCR Puffer II	5 µl
MgCl ₂ (25 mmol)	6 µl
dNTP	1 µl
Primer vorwärts (100 pM)	1 µl
Primer rückwärts (100 pM)	1 µl
pSKAC-PPI-1	5 µg
DNA Polymerase	0,25 µl

ad 50 µl *Aqua ad iniectabilia*.

Tabelle 2.4: PCR Temperaturbedingungen für GeneAmp® PCR System 9700

Sequenzaustausch PCR	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	94	10 min	1
Denaturierung	94	30 sek	35
Annealing	58	1 min	35
Synthese	72	1 min	35
Extinktion	72	10 min	1

Die amplifizierten PPI-1-Fragmente wurden über ein präparatives 0,5%iges DNA-Agarose Gel separiert. Die Bande wurde am UV-Transluminator ausgeschnitten, die DNA eluiert (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) und die Konzentration bestimmt.

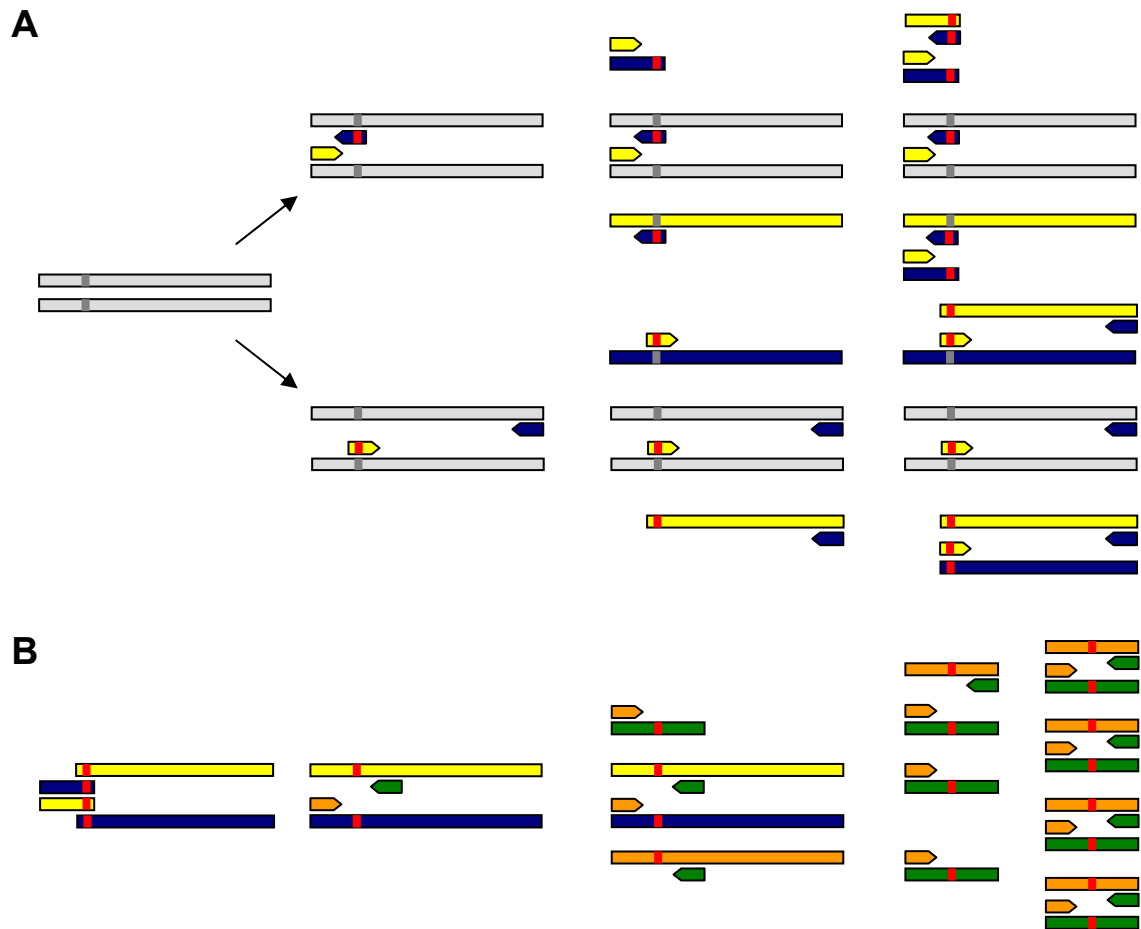


Abb. 2.1: Schematische Darstellung von Basenaustausch (A) und Trunkierung (B) des PPI-1_(-1-65, T35D) mit Hilfe der PCR. Erläuterung siehe Text.

2.2.1.2 Verknüpfung der Fragmente und Abspaltung der katalytischen Einheit

Für die Verknüpfung der beiden Fragmente mit ausgetauschten Aminosäuren wurden ein vorwärtslaufender Primer (5' (ac) (ac) (ac) ggt acc gcc atg gag ccc gac aac 3'), der 3 Basen vor dem Startcodon beginnt und ein rückwärtslaufender, gleichzeitig auf 195 kodierende Basenpaare verkürzender, Primer (5' cct cta gat gac agt gtg gac ttg ag 3') verwendet und in folgendem Reaktionsansatz gemäß Tabelle 2.4 amplifiziert (Vgl. Abb. 2.1 B).

PCR Reaktionsansatz:

10-facher PCR Puffer II	10 µl
MgCl ₂ (25 mmol)	12 µl
dNTP	2 µl
Primer vorwärts (100 pM)	2 µl
Primer rückwärts (100 pM)	2 µl
PPI-1 _(T35D) , N-Fragment	5 µg
PPI-1 _(T35D) , C-Fragment	5 µg
DNA Polymerase	0,5 µl

ad 100 µl *Aqua ad iniectabilia*.

Das PCR-Produkt wurde über ein präparatives 0,5%iges DNA-Agarosegel separiert, die PPI-1_(-1-65, T35D)-Bande am UV-Transluminator ausgeschnitten und die DNA eluiert.

2.2.2 Virusklonierung

Um die Funktion und Regulation von PPI-1 untersuchen zu können, wurde PPI-1 überexprimiert und für die hier vorgestellten Untersuchungen der adenovirale Gentransfer [112] zur Proteinüberexpression gewählt. Bei diesem System wird die DNA des zu untersuchenden Proteins erst in ein Plasmid eingeschleust, das einen Abschnitt enthält, der von Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen durchsetzt ist (MCS, multiple cloning site), mit deren Hilfe die DNA eingefügt wird. Diesem Abschnitt ist ein Promotor vor- und eine Polyadenylierungssequenz (pA) nachgeschaltet, so dass die gesamte Einheit die erfolgreiche Expression des zu untersuchenden Proteins in der Zelle gewährleisten soll. Einige Plasmide enthalten eine doppelte Expressionskassette, durch die zusätzlich ein Markerprotein koexprimiert wird. Das die DNA des zu untersuchenden Proteins enthaltende Plasmid wird durch homologe Rekombination in einen adenoviralen Vektor (AdEasy-1) kloniert. AdEasy-1 stammt von einem Adenovirus des Serotyps 5 ab, des durch Deletion der *Early Genes* E1 und E3 seine Pathogenität verloren hat. Die DNA des Konstrukts wird in E1 exprimierende, menschliche, embryonale Nierenzellen (HEK 293) transfiziert, in denen sich das Virus vermehren und später geerntet werden kann (s. Abb. 2.2).

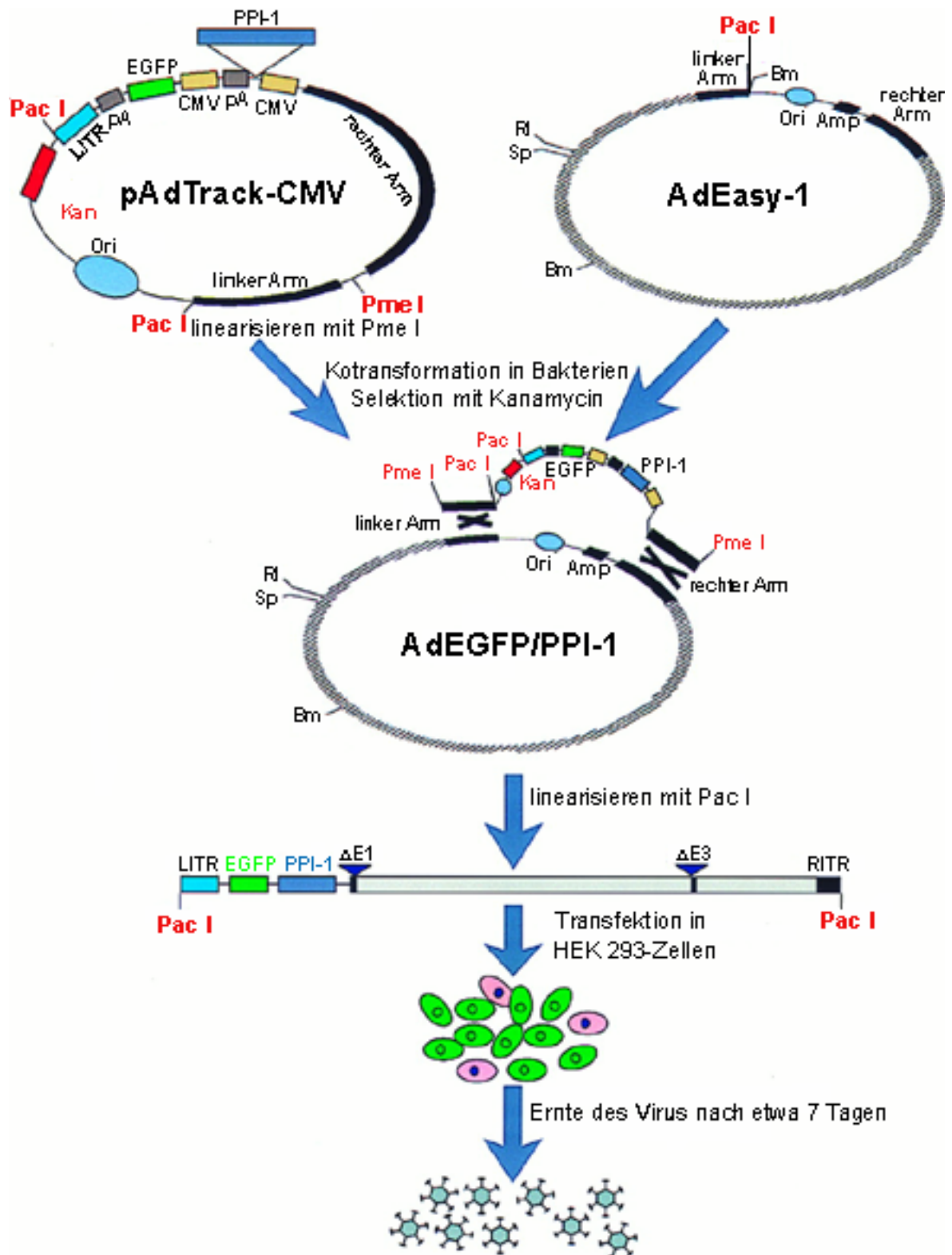


Abb. 2.2: Schema zur Virenkonstruktion mit AdEasy-1 und pAdTrack-CMV.
Entnommen aus [112].

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden verschiedene rekombinante Adenoviren verwendet (s. Abb. 2.3), wobei einige freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen bereitgestellt wurden. Dazu zählten AdEGFP (Volker Röneck, MediGene AG, München),

der ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP) unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert, AdEGFP/PPI-1 (Dr. Thomas Rau aus unserer Arbeitsgruppe), der PPI-1 und EGFP - kontrolliert von je einem CMV Promotor – koexprimiert und AdLacZ (INSERM U582, Institut de Myologie, Bâtiment Babinski, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris, Frankreich), der für β -Galaktosidase kodiert. Ausserdem wurden AdEGFP/PPI-1_(1-65, T35D) und AdPPI-1 kloniert, letzterer exprimiert nur PPI-1 unter Kontrolle eines CMV Promotors.

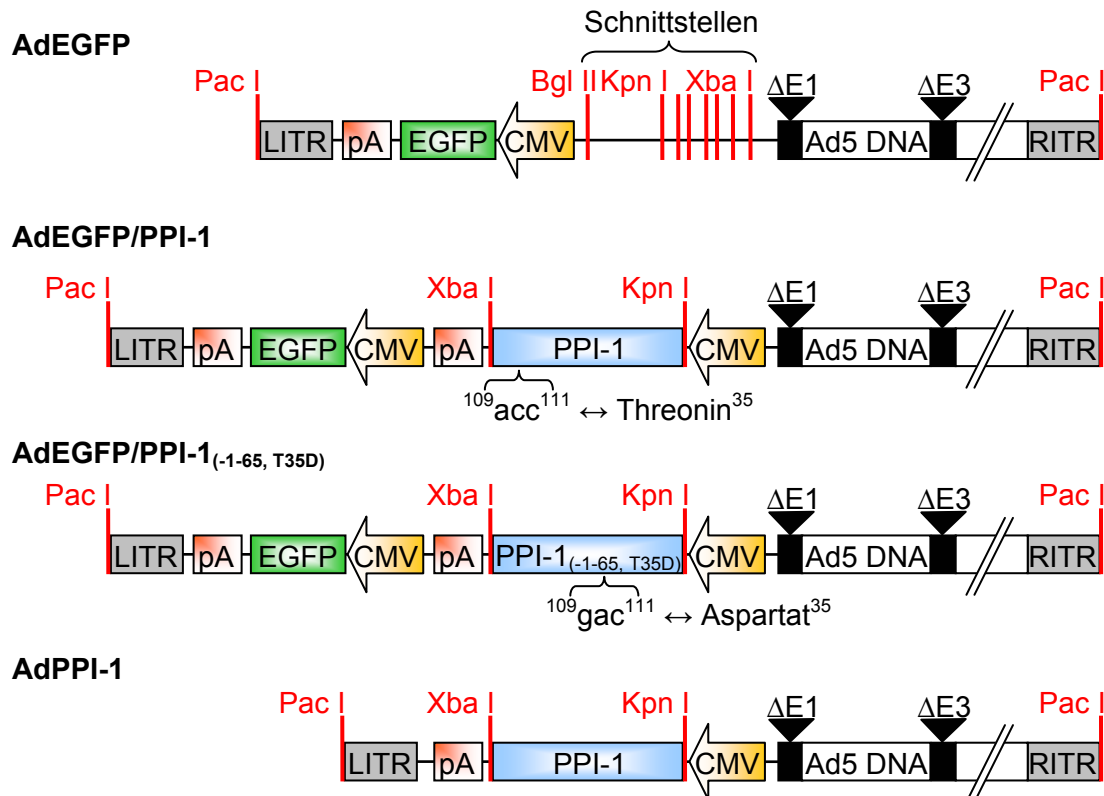


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der verwendeten rekombinanten Adenoviren.

2.2.2.1 Linearisierung des Plasmids

Als Plasmid für AdPPI-1 wurde plngo (s. Abb. 2.4) verwendet, das von Ingo Schubert (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen) aus pAdTrack-CMV hergestellt wurde. Für die Klonierung von plngo wurde mit dem Enzym Hpa I in den beiden pA Sequenzen bei 483 und 2.073 bp der EGFP kodierende Abschnitt, zusammen mit dem zugehörigen CMV Promotor herausgeschnitten. Das entstandene Plasmid umfasst 7.630 bp.

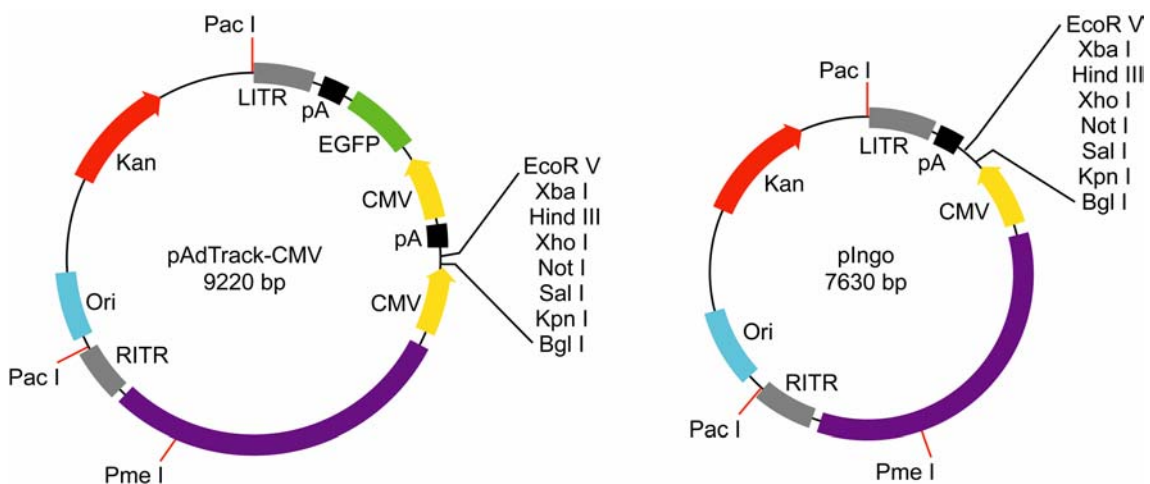


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Plasmide pAdTrack-CMV und plngo.

LITR und RITR, die linken bzw. rechten invertierten, terminalen Wiederholungen flankieren später die DNA des kompletten Konstrukts, da durch den Pac I-Verdau die Kanamycin-Resistenz (Kan) und deren Startregion (Ori) wegfällt. Bei pAdTrack-CMV wird sowohl das grün fluoreszierende Protein (EGFP), wie auch das zu überexprimierende Protein unter die Kontrolle eines Zytomegalievirus (CMV) Promotor gestellt. Das verkürzte plngo enthält kein Markerprotein. Am Ende steht jeweils die Polyadenylierungssequenz (pA). Die Linearisierung mit Pme I öffnet das Plasmid so, dass die, dem AdEasy-1 homologen, Abschnitte (violett) als linker und rechter Arm

Um das Gen, das exprimiert werden soll (*insert*), mit dem Plasmid ligieren zu können, muß das Plasmid zuerst an der MCS mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geöffnet werden. Die Enzyme werden so gewählt, dass sie an weniger wichtigen Enden des *inserts* schneiden, nicht jedoch die kodierenden Sequenzen zerstören.

Zur Linearisierung wurden 5 µg des Plasmids mit Xba I und Kpn I verdaut. Für einen Verdau wurde die angegebene Menge DNA ad 10 oder 20 µl *Aqua ad iniectionabilia* gemäß Tabelle 2.5 gemischt. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C 2 h inkubiert.

Nach dem Verdau wurde der Lösung 10% alkalische Phosphatase zugegeben und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert, das linearisierte Plasmid wurde aufgereinigt.

Tabelle 2.5: Sequenzen der Restriktionsendonukleasen und die Zusammensetzung der entsprechenden Ansätze.

Restriktions- endonukleasen	Sequenz	10% Puffer	10% 10xBSA	Enzymanteil
Eco0109 I	5' Pu G/GNCC Py 3' 3' Py CCNG/G Pu 5'	4,1 oder 2	ja	5%
Hpa I	5' GTT/AAC 3' 3' CAA/TTG 5'	4	nein	10%
Kpn I	5' GGTAC/C 3' 3' C/CATGG 5'	1	ja	10%
Nde I	5' CA/TATG 3' 3' GTAT/AC 5'	4 oder 2	nein	5%
Pac I	5' TTAAT/TAA 3' 3' AAT/TAATT 5'	1 oder 4	ja	5%
Pme I	5' GTTT/AAAC 3' 3' CAAA/TTTG 5'	4	ja	5%
Xba I	5' T/CTAGA 3' 3' AGATC/T 5'	2	ja	5%
EcoR I	5' G/AATTC 3' 3' CTTAA/G 5'	4, 1, 2 oder 3	nein	5%
BamH I	5' G/GATCC 3' 3' CCTAG/G 5'	2	ja	10%

2.2.2.2 Isolierung von PPI-1

PPI-1 wurde von Dr. Elmar Jäckel in pSKAC (Einzelheiten zu diesem Vektor siehe [75]) aufbewahrt. Zur Isolierung wurden 5 ng des Plasmids mit Xba I und Kpn I verdaut. Nach dem Verdau wurde die PPI-1-DNA im 0,5%iges DNA-Agarosegel separiert und eluiert.

2.2.2.3 Ligation und Fällen des Plasmids

Für die Ligation von linearisiertem Plasmid und *insert* wurden etwa 300 ng PPI-1 cDNA mit pIngo und 300 ng PPI-1_(-1-65, T35D) cDNA mit pAdTrack-CMV gemischt. Das Gemisch wurde mit je 10% des Ansatzvolumens 10x T4 DNA Ligase Puffer (enthält 10 mM ATP) und T4 DNA Ligase (400.000 units/ml) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Hälfte des Ligationsansatzes wurde 1 µl Glykogen gegeben, gevortext und die Ligation mit dem dreifachen Ansatzvolumen absolutem Ethanol bei -20 °C für 30 min gefällt. Die DNA wurde im Anschluss abzentrifugiert (4 °C, 20.800 g, 15 min), der Ethanol ab-

gesaugt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl *Aqua ad iniectabilia* aufgenommen.

2.2.2.4 Vermehrung elektrokompenter Bakterien

Zur Amplifikation der Plasmide wurden elektrokompente Bakterien verwendet, deren Bakterienwand durch einen kurzen elektrischen Puls „porös“ wird, dadurch kann das Plasmid in das Bakterium gelangen. In unserem Labor wurden DH10B und BJ5183, die beide von *Escherichia coli* abstammen, verwendet. Zur reinen Vermehrung von Plasmiden wurde stets DH10B der Vorzug gegeben, da sie effizienter sind. BJ5183 stellen alle zur Rekombination notwendigen Komponenten zur Verfügung und wurden ausschließlich für diese verwendet.

Zur Vermehrung der elektrokompenten Bakterien wurde 50 µl Bakteriensuspension auf einer Luria Broth (LB) Agarplatte ausgestrichen und übernacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt und übernacht in 6 ml Luria Broth (LB) Medium bei 150 U/min und 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag in 200 ml LB Medium gegeben. Bei 37 °C wurden BJ5183 bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,6-0,8 und DH10B bis 0,5-1,0 inkubiert. Bei 600 nm entspricht eine OD-Einheit etwa $0,8 \times 10^9$ Zellen je ml [37]. In 50 ml Portionen aufgeteilt, wurde die Bakteriensuspension eine Stunde auf Eis gestellt und anschließend viermal bei 4 °C und 3.200 g für 15 min zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen und das Pellet in je 50 ml vorgekühlter 10%iger Glycerollösung resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Pellets in je 200 µl 10%iger Glycerollösung aufgenommen, à 50 µl aliquotiert und bei – 80 °C tiefgefroren.

Luria Broth (LB) Agarplatten:

Trypton	5 g
NaCl	5 g
Hefe	2,5 g
1 N NaOH	0,5 ml

ad 500 ml *Aqua destillata*. Diese Lösung wurde zu 7,5 g Agar in eine Flasche gegeben und autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung im Wasserbad auf 56 °C abgekühlt. Unter einer sterilen Arbeitsbank wurde 125 mg Kanamycin zugegeben und der Inhalt der Flasche auf Zellkulturschalen verteilt (etwa 20 ml auf eine Schale von 10 cm Durchmesser (Ø)).

Luria Broth (LB) Flüssigmedium:

Trypton	5 g
NaCl	5 g
Hefe	2,5 g
1 N NaOH	0,5 ml

ad 500 ml *Aqua destillata* in eine Flasche gegeben und autoklaviert.

2.2.2.5 Transformation des Plasmids in die elektrokompetenten Bakterien

Zur Transformation des Plasmids in die Bakterien wurden 50 µl DH10B mit 10 µl Plasmid in die Elektroporationsküvette pipettiert, das Gemisch sofort elektroporiert (5,4 msek bei etwa 1,8 V) und mit 140 µl SOC-Medium aufgefüllt. Die Suspension wurde in ein verschliessbares Reaktionsgefäß überführt und bei 750 U/min und 37 °C 15 min geschüttelt. Auf zwei LB-Kanamycin Agarplatten wurden 50 µl und 150 µl der Suspension mit einem Gregalzki Spatel ausplattiert und übernacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:

Hefe	1 g
Trypton	4 g
10 M NaOH	0,2 ml
1 M KOH	0,5 ml
1 M MgCl ₂	2 ml
1 M MgSO ₄	4 ml
Glukose	793 g

ad 200 ml *Aqua ad iniectabilia*.

2.2.2.6 Vermehrung des Plasmids und Kontrolle des Einbaus durch Gelelektrophorese

Zur Vermehrung des Plasmids wurden drei Kolonien pro Agarplatte gepickt und in je 6 ml LB-Medium, versetzt mit Kanamycin, für 8-16 h bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt. Im Anschluß wurden die Bakterien eines Gefäßes durch Zentrifugieren bei 16.100 g für 30 s (Centrifuge 5810 R) und Verwerfen des jeweiligen Überstandes separiert. Das Plasmid wurde eluiert (Machery Nagel Kit zur Plasmidisolierung).

Zur Überprüfung des erfolgreichen Einbaus wurden 200-300 ng plngo oder pAdTrack-CMV und 5 µl der isolierten, ligierten Plasmide mit Nde I geschnitten. Die Reaktionsmische wurden auf ein 0,5%iges DNA-Agarosegel neben einen Größenstandard geladen. Bei 40-60 V wurde nach 45 min im UV-Transluminator die Größe und Anzahl der DNA Stücke

überprüft. Das zu erwartende Bandenmuster bei erfolgreichem Einbau ist der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

2.2.2.7 Sequenzierung der PPI-1 cDNA

Um sicherzustellen, dass die gewünschte cDNA eingebaut wurde, wurde eine Sequenzierung durchgeführt (s. 2.1.2 und 2.1.3). Als Primer wurden vorwärts 5' (ac) (ac) (ac) ggt acc gcc atg gag ccc gac aac 3', für plngo/PPI-1 rückwärts 5' (ct) (ct)t cta gat cag acc aag ctg gct cc 3' und für pTrack-CMV/PPI-1_(-1-65, T35D) rückwärts 5' cct cta gat gac agt gtg gac ttg ag 3' gewählt.

2.2.2.8 Rekombination des Plasmids mit BJ5183-AdEasy-1

Zur Rekombination wurden elektrokompente BJ5183-AdEasy-1 verwendet. BJ5183 verfügen über das *recA* Allel, welches für einen Proteinkomplex kodiert, der die Rekombination von zwei Plasmiden bewerkstelligt, sofern diese über einander homologe Regionen verfügen. In BJ5183-AdEasy-1 wurde pAdEasy-1 schon prätransformiert und über LB-Ampicillin Agarplatten selektioniert, so dass eine Kotransformation von beiden Plasmiden, umgangen werden konnte.

Zur Linearisierung wurden je 10-15 µg plngo/PPI-1 und pTrack/PPI-1_(-1-65, T35D) mit Pme I geschnitten, der Ansatz anschliessend mit 10% alkalischer Phosphatase weitere 2 h bei 37 °C inkubiert und aufgereinigt (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit).

Zur Rekombination wurden 500 ng linearisiertes Ligationsprodukt in 50 µl BJ5183-AdEasy-1 transformiert. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz ad 150 µl SOC-Medium bei 750 U/min und 37 °C 15 min geschüttelt. Das gesamte Gemisch wurde auf eine LB-Kanamycin Agarplatte ausgestrichen und übernacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden sechs Kolonien einer Rekombination gepickt und in je 5 ml LB-Medium, versetzt mit 30 µl Kanamycin 8-16 h bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt. Die Konzentration der Bakteriensuspensionen erfolgte durch zentrifugieren bei 16.100 g für 30 s und verwerfen des Überstandes. Das Plasmid wurde aus dem Pellet eluiert (Machery Nagel Kit zur Plasmidisolierung).

Zur Kontrolle wurden jeweils 10 µl Eluat der Rekombinationen und je 300 ng AdEasy-1 und plngo/PPI 1 oder pTrack/PPI-1_(-1-65, T35D) mit Pac I und Nde I geschnitten und die Größe der Fragmente in einem 0,5%igem DNA-Agarosegel überprüft. Die Tabelle 2.6 gibt gerundete Werte der zu erwartenden Banden an. Das Eluat positiver Klone wurde in DH10B transformiert und wie oben beschrieben vermehrt.

Tabelle 2.6: Längen von Plasmidfragmenten nach Verdau mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen.

Enzym	Plasmid	Größe der Schnittstücke [Basenpaare]	Plasmid	Größe der Schnittstücke [Basenpaare]
Nde I	AdEasy-1	18000, 8900, 6500;		
Pac I		Linearisiert das Plasmid.		
Nde I	pIngo	4000, 3600;	pAdTrack-CMV	4600, 3700, 1000;
Pac I		4700, 2900;		6300, 2900;
Nde I	pIngo-PPI-1	4600, 3600;	pTrack-PPI-1 _(-1-65, T35D)	4600, 3700, 1200;
Pac I		5300, 2900;		6500, 2900;
Nde I	AdPPI-1	16200, 8900, 5800, 4600;	AdPPI-1 _(-1-65, T35D)	16200, 8900, 5800, 4600, 1200;
Pac I		32000, 2900;		33200, 2900;

2.2.2.9 Aufbereitung der DNA für die Transfektion

Für die Transfektion der rekombinierten, adenoviralen Plasmide AdPPI-1 und Ad-EGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) muss deren cDNA mit Pac I linearisiert und die cDNA mit Glykogen gefällt werden (siehe auch 2.2.2.3). Das getrocknete Pellet wurde kurz vor der Transfektion in 15 µl *Aqua ad iniectabilia* aufgenommen, wovon 7,5 µl für die Transfektion einer Zellkulturschale von 3 cm Durchmesser (Ø) verwendet wurden.

2.2.3 Virusanzucht

2.2.3.1 Zellkultur und Transfektion von HEK 293-Zellen

Für die Adenovirus Anzucht ist eine S2-Genehmigung notwendig (E34-16/95). Es wurden HEK 293-Monolayer für die Herstellung hochtitriger Virussuspensionen verwendet. Durch die eingeschleuste E1-Region komplementieren HEK 293-Zellen die adenovirale DNA, so dass die Viren sich vermehren können. Der produktive Zyklus führt dann zur Lyse der Zelle, die zwar adhärenzfähige aber vermehrungsdefiziente Viren freisetzt.

Alle Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, die Hilfsgeräte autoklaviert oder steril verpackt im Handel erworben. Lösungen wurden autoklaviert,

sterilfiltriert oder steril und pyrogenfrei im Handel erworben. Zur Kultivierung der HEK 293-Zellen wurden Falcon Zellkulturschalen mit Zellkulturbeschichtung und einem Durchmesser von 14,5 cm verwendet. Die Bedingungen im Zellkulturschrank betragen konstant 37 °C bei 5% CO₂ Gehalt.

2.2.3.2 Vorbehandlung der Kulturschalen

Um die Adhäsion der Zellen zu verbessern, wurden die Zellkulturschalen zuerst mit 3 ml Kollagen I-PBS-Lösung (500 µl Kollagen I in 50 ml PBS [*phosphate buffered saline*]), der 1% Penicillin G und Streptomycin (P/S; 10.000 U/ml und 10.000 µg/ml) beigesetzt wurde, überschichtet. Anschliessend wurden pro Ø 14,5 cm Zellkulturschale 25 ml 10%-HEK-Medium zugegeben. 10%-HEK-Medium enthält als Kulturmedium Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), dem 10% fetales Kälberserum (FKS), 1% L-Glutamin und 1% P/S beigefügt wurde. FKS wurde zuvor bei 56 °C für 1 h inaktiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Auf eine Zellkulturschale mit Ø 14,5 cm wurden im Rahmen der Passagierung etwa 4x10⁶ Zellen gegeben.

2.2.3.3 Kultivieren/Passagieren von HEK 293-Zellen

Zeigten sich die Zellen einer Zellkulturschale konfluent wurde eine Passagierung durchgeführt. Jede Ø 14,5 cm Schale wurde mit PBS gespült und mit 5 ml Citrat-Salz-Lösung für 2 bis maximal 4 min im Zellkulturschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Schwenken und Abklopfen gelöst, die Lyse durch die Citrat-Salz-Lösung mit 5 ml HEK-Medium gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert (Centrifuge 5810 R; 4 °C, 800 g, 1 min), der Überstand verworfen und die so erhaltene Zellsuspension einer auf fünf neue Zellkulturschalen verteilt.

Citrat-Salz-Lösung:

KCl	5,3 g
Na ₃ Citrat · (H ₂ O) ₂	2,2 g

ad 500 ml *Aqua destillata*.

Die gemischte Lösung wurde autoklaviert.

2.2.3.4 Transfektion des Ligationsprodukts in HEK 293-Zellen

Für die Liposomen vermittelte Transfektion des linearisierten pAdPPI-1 oder pAd-EGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) wurde eine Ø 3,5 cm Zellkulturschale mit HEK 293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-95% kultiviert. Das 10%-HEK-Medium wurde durch 1 ml optiMEM ersetzt. In zwei Sammelgefäßen wurden 5 µl Lipofektamin und 5 µg linearisiertes Plasmid in je 250 µl optiMEM 5 min inkubiert. Danach wurden die beiden Ansätze gemischt und

weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf die HEK 293-Zellen gegeben und 6 h im Zellkulturschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Transfektionslösung durch 10% HEK-Medium ersetzt.

Zur Ernte sollten bereits 30-50% der transfizierten HEK 293-Zellen abgelöst sein, die noch anhaftenden Zellen wurden mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abgespült. Die Zellen wurden bei 4 °C und 600 g 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, im 37 °C Wasserbad aufgetaut und gevortext. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

2.2.3.5 Infektion der HEK 293-Zellen mit Adenoviren

Für die Infektion von HEK 293-Zellen mit Adenoviren wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Mit der gesamten Virussuspension aus der Ø 3,5 cm Zellkulturschale wurde eine Ø 10 cm Schale infiziert, die analog oben beschriebener „Frier-Tau-Vortex“ Methode geerntet wurde. Bei jeder Passage kann etwa das 10-fache an Viren gewonnen werden und eine entsprechende Anzahl neuer HEK 293-Schalen infiziert werden.

Lag für die Virusanzucht bereits ein adhärenzfähiges Virus vor, wurden die Zellkulturschalen mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 5-10 pro Zelle infiziert.

2.2.3.6 Präparation einer hochtitrigen Virussuspension

Infolge der Virusvermehrung runden sich die infizierten HEK 293-Zellen langsam ab, lösen sich vom Boden der Zellkulturschale und lysieren schließlich innerhalb von etwa 3-4 Tagen. Ein guter Zeitpunkt für die Ernte ist gegeben, wenn etwa die Hälfte der Zellen sich abgelöst hat. In ein kleineres Volumen überführt werden die Viren durch „Frier-Tau-Vortex“ Zyklen freigesetzt und über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt.

2.2.3.7 CsCl-Gradient zur Aufreinigung und Konzentration

Die infizierten HEK 293-Zellen wurden bei 4 °C und 600 g 10 min zentrifugiert, deren Überstand aufbewahrt, die Pellets in 7,5 ml PBS resuspendiert und vier „Frier-Tau-Vortex“ Zyklen unterworfen. Diese Suspension wurde bei 4 °C und 1.800 g, 15 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu separieren. Das Pellet wurde bei -80 °C aufbewahrt, der Überstand dreimal mit vorgekühltem 1,1,2-Trichlortrifluorethan extrahiert.

Der CsCl-Gradient besteht aus einer schweren (42,2% w/w) und einer leichten (22,4% w/w) CsCl-Phase, von denen je 4,5 ml in den Ultrazentrifugationsröhrchen übereinander geschichtet wurden. Der nach der Trichlortrifluorethan Extraktion gewonnene Überstand wurde vorsichtig in äquivalenter Menge auf die Gradienten geschichtet. Gewichtsunterschiede wurden mit PBS ausgeglichen. Nach 18 h Zentrifugation

(Ultrazentrifuge L7-65, SW40 Ti Rotator, Beckman Coulter, Krefeld) bei 4 °C und 27.000 Umdrehungen pro Minute (entspricht durchschnittlich 92.000 g, maximal 130.000 g) waren zwei weiße Banden an der Interphase zwischen schwerer und leichter Phase sichtbar. In der sehr schwachen oberen Bande befinden sich Viruskapseln, in der dicken unteren Bande komplette Viren. Die untere Bande wurde in eine Heparinspritze mit G27-Kanülen aufgenommen und in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer®10K MWCO; Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) überführt. Jeweils eine Kassette wurde zweimal 2 h gegen 1 l PBS und übernacht gegen 1 l *Virus Storage Buffer* (VSB) dialysiert.

Virus Storage Buffer (VSB):

NaCl	8 g
KCl	372 mg
MgCl ₂ · (H ₂ O) ₆	204 mg
1 M Tris-HCl, pH=7,4	10 ml

ad 1000 ml *Aqua ad iniectabilia*.

Der VSB wurde autoklaviert.

Schwere CsCl-Lösung:

CsCl	42,2 g
------	--------

Leichte CsCl-Lösung:

CsCl	22,4 g
------	--------

jeweils ad 100 g VSB.

Die Lösungen wurden sterilfiltriert.

Das Dialysat wurde aus der Kassette entnommen, 400 µl zur DNA-Bestimmung aufbewahrt, das verbleibende Volumen 1:1 mit 2xGlycerol-VSB verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2xGlycerol-VSB:

NaCl	292,2 mg
BSA	50 mg
1 M Tris, pH=8,0	0,5 ml
Glycerol	25 ml
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	25 ml

Das Gemisch wurde sterilfiltriert.

2.2.3.8 Dichtebestimmung der biologisch aktiven Viren

Zur Dichtebestimmung der biologisch aktiven Viren (BAV) wurde die DNA extrahiert, gefällt und die Konzentration bestimmt. Dabei entsprechen 21 ng DNA $6,2 \times 10^8$ Viruspartikel, wobei empirische Daten aus unserem Labor zeigten, dass in KMNR 1/30 der Viruspartikel biologisch aktiv ist, basierend darauf wurde die BAV berechnet.

Zur DNA Extraktion wurden 400 µl Dialysat mit TNE-Puffer ad 600 µl verdünnt. Der Lösung wurden jeweils 1/10 des Ansatzvolumens 10% Natriumdodecylsulfat (SDS), 2,5 M β-Mercaptoethanol, sowie Proteinase K (5 mg/ml) zugegeben und dazwischen jeweils

30 min bei 37 °C inkubiert. Auf Eis wurde die DNA durch 800 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 2.600 g weiter gereinigt. Es waren zwei Phasen mit Interphase zu beobachten. In der unteren befindet sich Lösungsmittel, darüber eine dünne Schicht mit Proteinen, während die obere Phase DNA enthält. Entsprechend wurde die DNA-Phase abgenommen und weitere dreimal mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch gereinigt. Der Überstand wurde noch einmal mit 800 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gewaschen und die DNA aus der oberen Phase mit äquivalentem Volumen Isopropanol und 1/10 des Ansatzvolumens 3 M NaAzetat, pH=5,4 für 2 h bei -20 °C präzipitiert. Die DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 20.800 g gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl *Aqua ad iniectabilia* aufgenommen, die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt und die BAV errechnet.

TNE-Puffer:

5 M NaCl	200 µl
0,5 M EDTA	20 µl
1 M Tris, pH=7,4	100 µl

ad 10 ml *Aqua ad iniectabilia*.

Die Viren-DNA kann zur Abschätzung der Konzentration mit AdEasy-1 oder λ-Phagen-DNA im Agarosegel verglichen werden. Hierzu wurden aufsteigende Konzentrationen der λ-Phagen-DNA mit Eco0109 I oder des AdEasy-1 mit Pac I verdaut. λ-Phagen besitzen drei Eco0109 I Schnittstellen und werden in Fragmente von 29, 2.815, 19.670 und 25.980 bp zerteilt. Das 25.980 bp umfassende Fragment läuft im Agarosegel etwa in Höhe der gefalteten Viren-DNA. Da dieses Fragment etwa die Hälfte der gesamten λ-Phagen-DNA ausmacht, wurde von der AdPPI-1 DNA die Hälfte der, für das Gel verdauten Phagen DNA-Menge geladen. Die Banden wurden nach 1 h Laufzeit im UV-Transluminator verglichen und densitometrisch ins Verhältnis gesetzt (Auswertungssoftware MultiAnalyst, BioRad, München).

2.2.3.9 Infektionsnachweis mittels LacZ-Assay

AdLacZ kodiert für das Enzym β-Galaktosidase, welches das Laktoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-galaktopyranosid) zu einem blauen Reaktionsprodukt abbaut. Unter dem Mikroskop kann so die erfolgreiche Infektion einer Zelle mit AdLacZ nachgewiesen werden. Hierzu wurden AdLacZ infizierte Zellen in der Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen und 6 h bei 37 °C mit LacZ-Assay-Lösung inkubiert. Die

Zellen wurden im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen und in 4% Formaldehyd in PBS fixiert.

X-Gal-Lösung:

X-Gal	100 mg
Dimethylformamid (DMF)	5 ml

Bei -20 °C aufbewahrt.

Lac-Z-Assay-Lösung:

$K_3[Fe(CN)_6]$	20 mM
$K_4[Fe(CN)_6] \cdot (H_2O)_3$	20 mM
$MgCl_2 \cdot (H_2O)_6$	2 mM
Igepal CA-630	0,02%
Natriumdesoxycholat	0,01%

ad 1 l *Aqua ad iniectabilia*.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde X-Gal-Lösung im Verhältnis 1:20 zugegeben (Endkonzentration X-Gal: 1mg/ml).

2.3 Zellkultur

Die Kultivierung der EHT und Kardiomyoyten-Monolayer erfolgte in einem Zellkultur-schrank bei konstant 37°C und 5% CO₂.

2.3.1 Zellpräparation von Kardiomyozyten der neonatalen Ratte

Die Präparation der Kardiomyozyten neugeborener Ratten (KMNR) gemäß Münzel et al. [171] wurde freundlicherweise von Beate Endres (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen) übernommen.

Die Präparation erfolgte aus neonatalen Wistar-Ratten (1.-3. Tag postnatal). Nach Entnahme des Herzens wurde der Vorhof abgetrennt und die Ventrikel in calcium- und bicarbonatfreiem Puffer gelagert. Die anschließende Verabeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zur antibiotischen Abschirmung wurden Penicillin G und Streptomycin (P/S) eingesetzt. Der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin erfolgte nach einer modifizierten Methode von Webster et al. [243].

Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mehrmals im Wechsel mit Trypsin- und DNase-haltiger Lösung inkubiert, auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) geschwenkt und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; 60 g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und gepoolt. Zum Sammelvolumen wurde DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert und erneut zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 32 ml NKM resuspendiert und durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten, Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

NKM:

- Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃)
- 10% FKS (inaktiviert)
- 1% P/S
- 1% L-Glutamin

2.3.2 Kardiomyozyten in Monolayer-Kultur

2.3.2.1 Beschichten von Zellkulturschalen

Um das Anheften der Kardiomyozyten aus der neonatalen (1-3 Tage) Ratte (KMNR) am Kulturschalenboden zu erleichtern, wurden die Kulturschalen (Falcon, Heidelberg) mit Gelatinehaltiger Lösung (1% Gelatine und 1% P/S in PBS, sterilfiltriert) beschichtet.

2.3.2.2 Aufreinigen der Kardiomyozyten

Die KMNR für Monolayer-Kultur wurden auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser (Falcon, Heidelberg) verteilt. Das Volumen wurde auf etwa 12 ml pro Schale aufgefüllt und die Zellen für ca. 1 h im Zellkulturschrank inkubiert, um eine Anreicherung der Kardiomyozyten auf etwa 70% im Überstand durch ihre, im Vergleich zu den Nicht-Kardiomyozyten langsamere Anheftung zu erreichen (Preplating). Anschließend wurden die Kulturschalen intensiv mit den Überständen gespült und alle Überstände in ein Sammelgefäß (50 ml) überführt. Die Zellzählung erfolgte nach Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer.

2.3.2.3 Aussaat und Kultur von KMNR

Anschliessend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; 60 g, 15 min, 4 °C) und überstehendes NKM abgenommen, um die KMNR anschließend in Kardiomyozyten-Medium (KM-Medium) vorsichtig zu resuspendieren. KMNR wurden in der Regel in einer Dichte von etwa $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/cm² auf gelatinebeschichteten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in 2 ml KM-Medium ausgesät und im Zellkulturschrank kultiviert. Um die Überwucherung der KMNR durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das KMNR-Medium den Antimetaboliten 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU). Nach 24 h war ein großer Teil der KM angeheftet und die ersten spontanen Kontraktionen waren zu beobachten. Der erste Mediumwechsel wurde 36 h nach der Aussaat vorgenommen.

KMNR-Medium:

Minimum Essential Medium (MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin)

10% FKS (inaktiviert)

1% 10 mM BrdU

1% P/S

2.3.3 Herstellung von rekonstituiertem Herzgewebe (EHT)

Zur Herstellung des *engineered heart tissue* (EHT) aus KMNR wurden Hühnerembryonenextrakt, Kollagen I und Gussformen benötigt, hierzu wird auf die Dissertation von Dr. rer. nat. Felix Münzel [171], Abschnitt Material und Methoden, 2.2, 2.3 und 2.4.1 verwiesen.

2.3.3.1 Herstellung von EHTs

Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Kollagens zu verhindern. Die gewünschte Menge Kollagen Typ I wurde vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der, zu diesem Zeitpunkt saure, pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 M) neutralisiert. Die Zugabe von extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA) erfolgte anschließend vor der Vermengung mit der Zellsuspension. Nach wiederholtem Titrieren des Kollagen-Zell-Gemisches wurden davon je 900 µl zügig in die Gussformen pipettiert (Abb. 2.5). Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 h im Zellkulturschrank inkubiert und nachfolgend mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) überschichtet.

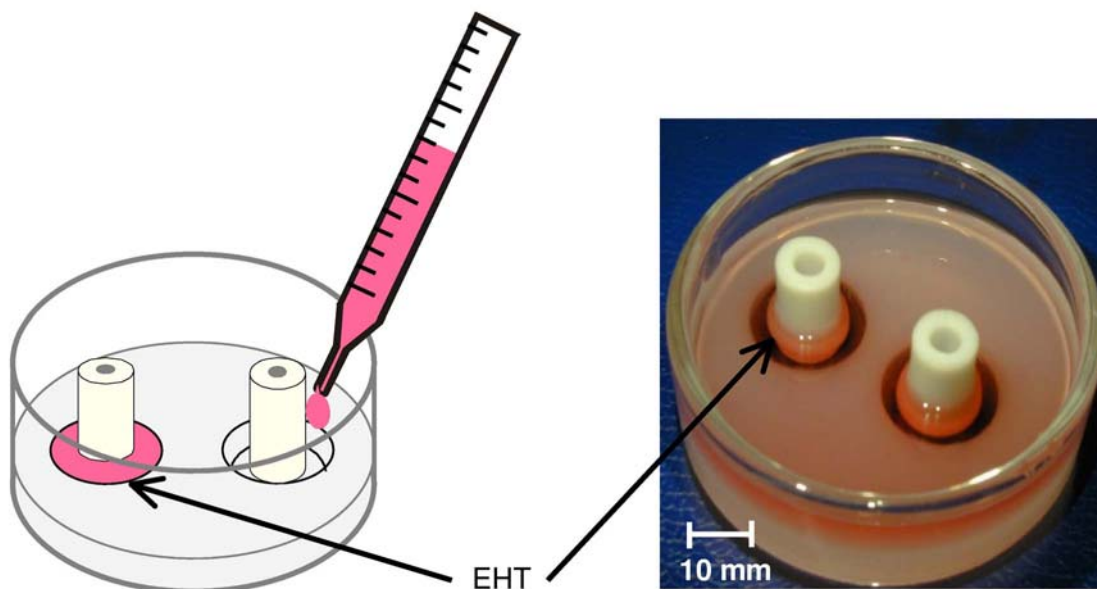


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Ausgießens von EHTs (links) und Fotografie einer Gussform mit EHTs am 6. Kulturtag (rechts).

10x DMEM:

10x DMEM Pulver	133 mg
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	10 ml

Zweifach konzentriertes EHT-Medium:

10x DMEM	1,0 ml
Pferdeserum (inaktiviert)	1,0 ml
Hühnerembryonenextrakt	0,2 ml
P/S	0,1 ml

ad 5 ml *Aqua ad iniectabilia*.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs:

Kollagen (5,5 mg/ml)	640 µl	→ 0,8 mg/EHT
2x EHT-Medium	640 µl	
0,1 M NaOH	139 µl	
extrazelluläre Matrix	400 µl	→ 10%
Zellsuspension ($5,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml)	2181 µl	→ $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/EHT

Um mit der Zellsuspension auf 4 ml aufzufüllen, wurde die Zellkonzentration entsprechend eingestellt.

EHT-Medium:

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3)
10% Pferdeserum (inaktiviert)
2% Hühnerembryonenextrakt
1% P/S

2.3.4 Kultivierung von EHT

Die Kultur der EHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen, das Medium wurde am ersten, dritten und fünften Tag nach Herstellung gewechselt. An Tag 7 wurden die EHTs auf eine Dehnapparatur (s. Abb. 2.6) transferiert. Die Frequenz der Dehnung belief sich auf 1,33 Hz, die Kulturdauer betrug 11-15 Tage.

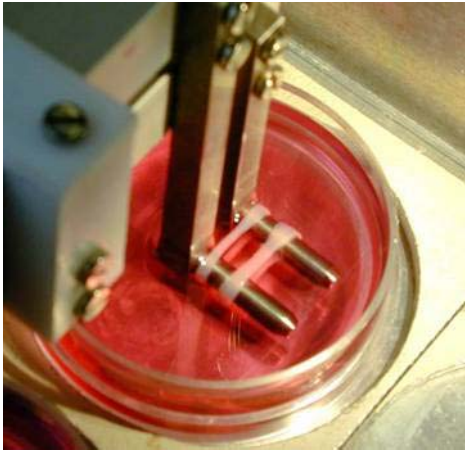


Abb. 2.6: Photographie einer Einheit der Dehnapparatur mit zwei EHT.

2.3.5 Interventionen

2.3.5.1 EHT

Die Infektion wurde, falls nicht anders im Text beschrieben, an Tag 10-12 für 24-48 h durchgeführt. Die Menge Virus, die nötig war um in zwei EHTs eine MOI von 50-100 zu erreichen, wurde ad 500 μ l Minimal Essential Medium mit Earl's Salzen (MEM), welches mit 1% P/S versetzt war, verdünnt. Es wurde davon ausgegangen, dass sich in einem EHT, wie bei der Herstellung, $2,5 \times 10^6$ Zellen befanden. Das EHT-Medium wurde abgesaugt, jeweils zwei EHTs mit 500 μ l obiger Lösung beträufelt und 60 min unter rhythmischer Dehnung im Zellkulturschrank inkubiert. Die Kontrollen wurden mit 500 μ l MEM inkubiert. Nach 1 h wurde dann je 2 ml EHT-Medium pro Schale hinzugegeben und die Ringe weitere 24-48 h gedehnt. Zur Überprüfung der Infektion von EHTs die mit EGFP kodierenden Viren infiziert worden waren, wurde die grüne Fluoreszenz unmittelbar vor den Kontraktionsexperimenten im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) überprüft und photographisch festgehalten. Wurden die EHTs mit Viren infiziert, die EGFP nicht koexprimierten, wurde die Effizienz im Westernblot, bei Infektion mit AdLacZ mit Hilfe der X-Gal Spaltung (analog des LacZ-Assays in 2.2.3.9 an Monolayer Zellkulturen) exemplarisch an einem EHT nachgewiesen.

2.3.5.2 KMNR

Die Infektion der Monolayer Zellkulturen mit rekombinanten Adenoviren erfolgte am vierten Tag, mit einer MOI von zwei für 48 h, falls im Text nicht anders angegeben. Um eine möglichst homogene Infektion zu gewährleisten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem 10%-KM-Medium-Virus Gemisch überschichtet.

Die erfolgreiche Infektion wurde vor der Ernte - falls im Text nicht anders angegeben 48 h nach Infektion – durch die grüne Epifluoreszenz von EGFP am LSM überprüft. Dienten β -Galactosidase-überexprimierende KMNR als Kontrollen, wurde stichprobenartig eine Schale dem LacZ-Assay (s. Kap. 2.2.3.9) zugeführt.

Um die Auswirkungen adrenerger Stimulation zu untersuchen wurden die Zellen an Tag 6 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-7} M) Isoprenalin (DL-Isoproterenol hydrochloride; Sigma, Taufkirchen), einem unselektiven β -Rezeptoragonist oder 15 min mit 10^{-5} mol/l Phenylephrin ((R)-(-)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol hydrochloride; Sigma, Taufkirchen), einem α_1 -Agonisten, stimuliert.

2.4 Erfassung der Kontraktionsdaten

2.4.1 Kontraktionsmessung

An Kulturtag 11-15 wurden die Kontraktionsparameter der EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (0,2-0,4 mM Calcium) in temperierten Standardorganbädern (s. Abb. 2.7) ermittelt. Die Aufhängung der EHTs erfolgte zwischen induktiven Kraftaufnehmern und statischen Haltepolen. Die Kontraktionsexperimente wurden unter elektrischer Stimulation (Frequenz 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 20% über der Reizschwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) durchgeführt. Alle Interventionen wurden an optimal vorgedehnten Muskelpräparaten (L_{max}) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten der Interventionen wurden zur Äquilibration Pausen von jeweils 5 min eingelegt. Als L₀ wurde die durch die Dehnapparat im ungedehnten Zustand vorgegebene Gewebelänge (14,5 mm) definiert.

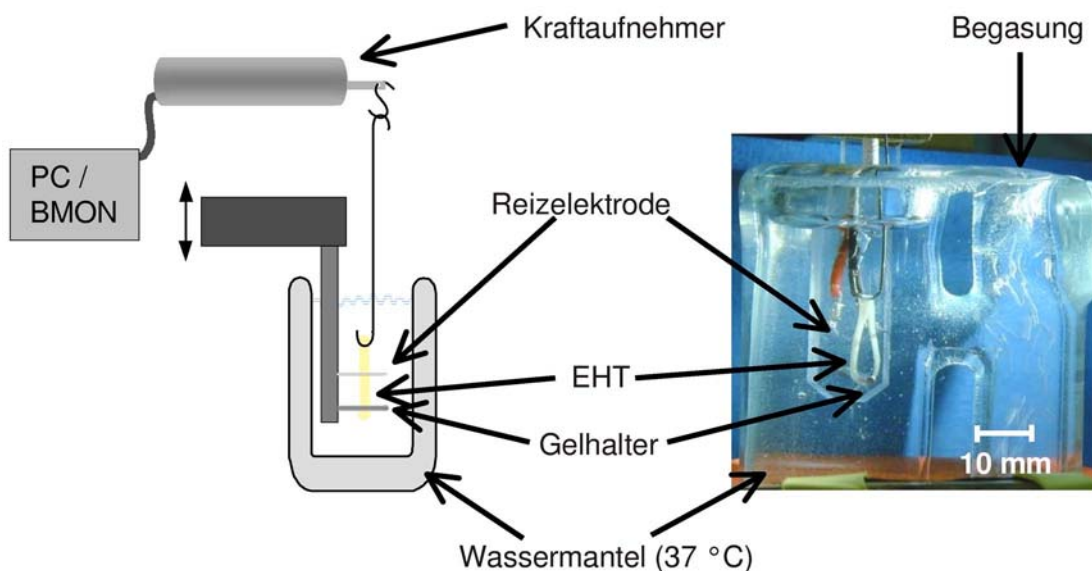


Abb. 2.7: Darstellung eines Organbades.

Nach 60 min Äquilibration in Tyrode-Lösung mit 0,4 mM Calcium wurde unter elektrischer Stimulation die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von L₀ auf L_{max} gesteigert und damit die Kraft-Längen Beziehung ermittelt. Anschließend wurde in Tyrode-Lösung mit 0,2 mM Calcium 15 min äquiliert. Die Kontraktionsparameter wurden unter steigenden Konzentrationen von Calcium (0,4 - 2,8 mM) ermittelt. Nach zweimaligem Wechsel der Tyrode-Lösung und Verminderung der Calcium-Konzentration auf 0,2 mM erfolgte die Bestimmung der Reaktion auf β -adrenerge Stimulation durch eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin (10^{-10} - 10^{-6} M).

Nach den Kontraktionsversuchen wurde ein Großteil der EHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung:

NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂	0,2 mM
MgCl ₂	1,05 mM
NaHCO ₃	22,6 mM
NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
Glucose	5,05 mM
Na ₂ EDTA	0,05 mM
Ascorbinsäure	0,56 mM, in <i>Aqua destillata</i> .

CaCl₂-Stamm 2,25 M:

CaCl₂ · (H₂O)₂ 165,57 g
ad 500 ml *Aqua destillata*.

Stamm II für Tyrode-Lösung:

NaHCO₃ 50 g
ad 1000 ml *Aqua destillata*.

MgCl₂-Stamm 1,05 M:

MgCl₂ · (H₂O)₆ 106,83 g
ad 500 ml *Aqua destillata*.

Stamm III für Tyrode-Lösung:

NaH₂PO₄ 5,8 g
ad 1000 ml *Aqua destillata*.

Stamm I für Tyrode-Lösung:

NaCl 175 g
KCl 10 g
CaCl₂-Stamm 2,22 ml
MgCl₂-Stamm 25 ml
ad 1000 ml *Aqua destillata*.

Modifizierte Tyrode-Lösung:

Stamm I 40 ml
Stamm II 38 ml
Stamm III 10 ml
Glucose 1 g
Ascorbinsäure 100 mg
Na₂EDTA 18,6 mg
ad 1000 ml *Aqua destillata*.

2.4.2 Datenerfassung und -verarbeitung

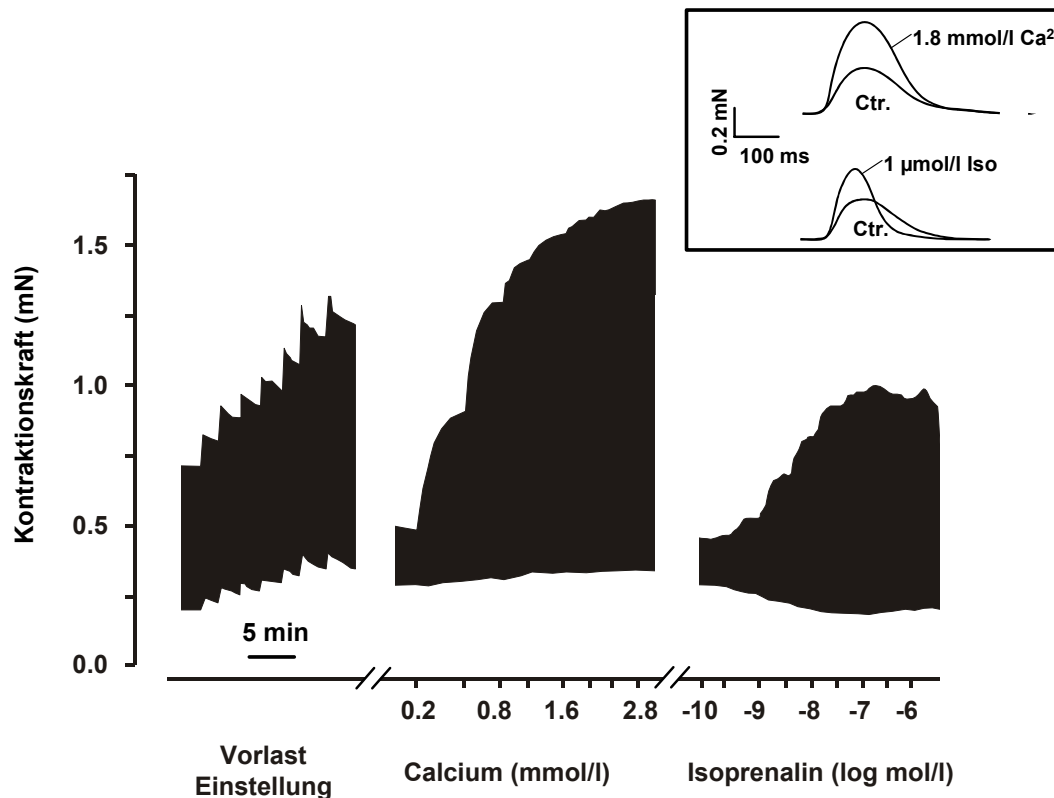


Abb. 2.8: Darstellung der Kontraktionsparameter.

Beispiel einer Einzelkontraktion (kleines Kästchen) mit Betonung der unterschiedlich verlaufenden Kurve bei differierender Stimulation, sowie eine Übersicht über die Aufzeichnung einer gesamten Messung.

Die Erfassung der Daten erfolgte mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Die Messverstärker wurden vor jeder Messung mittels eines Gewichtes von 100 mg kalibriert. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch das Programm als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler Kraft und der Grundspannung errechnet. Die Auswertung der Zeiten erfolgte in der Regel von 90% Kontraktion bis maximaler Kontraktion (T1) bzw. von maximaler Kontraktion bis 90% Relaxation (T2). Die minimale Auflösung der Datenerfassung betrug 0,01 mN. Zur exakten Erfassung der aufgezeichneten Daten wurden die Zeitpunkte, an welchen etwa eine Änderung der Konzentration erfolgte, manuell festgelegt, damit anschließend die Weiterverarbeitung mittels Tabellenkalkulation (EXCEL[®], Microsoft AG, Ismaning) erfolgen konnte.

2.5 Erfassung biochemischer Parameter

2.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinquantifizierung von Proben, die kein SDS enthielten, wurde mit dem Biorad Protein Assay Reagenz (Biorad, München) nach nach Angaben des Herstellers [29] durchgeführt.

2.5.2 Semiquantitative Erfassung bestimmter Proteine

Bei der Etablierung des semiquantitativen Nachweises bestimmter Proteine mittels Immunoblot in EHTs stellte sich die Aufarbeitung der EHTs zu Lysaten als kritischer Schritt für die Qualität der Ergebnisse dar. Hierbei zeigte sich die Homogenisierung mittels Polytron und anschließende wiederholte Aspiration mit feinen Kanülen in dem unten beschriebenen Lysepuffer gegenüber anderen Methoden überlegen. Nach dieser Methode kam es zu einer fast vollständigen Auflösung des Kollagens und bei der Auswertung des Immunoblots zu klaren, unverschmierten Banden.

2.5.2.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion aus Monolayer Zellkulturen wurde 500 µl Lysepuffer pro 10⁶ Zellen zugegeben und die KMNR in einem Sammelgefäß dreimal 15 s mit einem Politron homogenisiert.

Zur Extraktion aus EHTs wurden diese in Stickstoff gefroren mit einem Skalpell zerkleinert und in 300 µl Lysepuffer gegeben. Die Fragmente wurden viermal 20 s polytronisiert und durch je zehnmaliges Aspirieren mit einer G20, G24 und zuletzt mit einer G27 Kanüle homogenisiert. Nach Zentrifugation (400 g, 3 min) wurde der Überstand weiterverwendet.

Lysepuffer :

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	1 ml
1 M NaF	3 ml
SDS (20%)	15 ml
Glycerol	10 ml

ad 100 ml *Aqua destillata*.

Vor Benutzung wurde 2 µg/ml Aprotinin dazugegeben.

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach

Lämmli [149]:

SDS	1,2 g
Glycerol	6,0 g
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	6 mg
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,2 ml

ad 10 ml *Aqua destillata*.

2.5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese erfolgte nach Lämmli [149] mit SDS-haltigem Puffer. Jede Proteinprobe wurde mit 20% des Probenvolumens an sechsfachkonzentriertem Puffer nach Lämmli [149] versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Benutzt wurde ein Sammelgel (5%) und je nach Proteingröße ein Trenngel mit 12-18% Polyacrylamid.

Trenngel (18%) für 2 Gele:

Acrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)	6,0 ml
<i>Aqua destillata</i>	1,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	4,0 µl

Sammelgel (5%) für 2 Gele:

Acrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)	0,85 ml
<i>Aqua destillata</i>	2,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10%)	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,05 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	5,0 µl

Die Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern in vorgekühltem Laufpuffer mit 25 mA die ersten 30 min, dann mit 60 mA bis die Farbfront den unteren Gelrand erreichte. Auf jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard mitgeführt.

Laufpuffer:

Tris	3,02 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g

ad 1000 ml *Aqua destillata*.

2.5.2.3 Immunoblot und Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch ein Nassblot-Verfahren im elektrischen Feld entweder auf eine hydrophobe Polyvinyliden-Difluorid-Membran oder auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm Porengröße) übertragen

[233]. Phospholamban gesamt, die Serin¹⁶- oder Threonin¹⁷- Phosphorylierung wurden nur auf die PVDF-Membran, alle anderen Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte bei Verwendung der PVDF-Membran stromkonstant mit 400 mA, bei der Nitrocellulosemembran mit 500 mA oder für beide Membranen bei -4 °C und 20 V übernacht. Um den erfolgreichen Transfer zu kontrollieren, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und die Höhe der Banden des ungefärbten Proteinstandards dauerhaft markiert. Die Membranen wurden entsprechend des, zu erwartenden, Molekulargewichts der Proteine in horizontale Streifen geschnitten. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran in TBS mit TWEEN 20 (TBST) gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 5% Magermilchpulver oder 2% Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in TBST, für 60 min inkubiert.

Abhängig vom primären Antikörper wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen (Antikörper in TBST verdünnt) oder der primäre Antikörper wurde sofort zugegeben (Antikörper in Trockenmilch-Lösung verdünnt). Die Inkubation der primären, gegen das jeweilige Protein spezifischen Antikörper erfolgte unter leichtem Schütteln für 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Verdünnungen und Lösungsmittel der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 2.7 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in Trockenmilch-Lösung für 1 h. Dieser ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt. Anschließend wurde dreimal in TBST gewaschen und die Membran für 5 min mit dem ECL+ Western-Blot Detections-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert. Zur Visualisierung wurden Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) belichtet und sofort entwickelt (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Wenn es nicht möglich war, die Ladekontrolle durch Schneiden der Membran parallel mitzuführen, wurden die Antikörper wieder von den Membranen entfernt. Hierzu wurden die Membranen mit ECL-Strip-Puffer für 30 min bei 50 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend mehrmals mit TBST gewaschen. Anschließend konnte die Membran erneut mit einem primären Antikörper inkubiert und der oben beschriebenen Prozedur ein weiteres Mal unterworfen werden.

Tabelle 2.7: Antikörper für den Immunoblot.

Protein/Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer	sekundärer Antikörper	Verdünnung	Ladekontrolle
Calsequestrin	1:2500 in TBST	Affinity bioreagents	PA1-913	anti-rabbit (Sigma)	1:15000 in Milch	
Phospho-DARPP-32 (Threonin34/35)	1:2000 in TBST	Cell Signaling Tec.	2304	anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
ERK, gesamt	1:1000 in Milch	Cell Signaling Tec.	9102	anti-rabbit (Cell Signaling Tec)	1:1000 in Milch	
Phospho-ERK	1:1000 in Milch	Cell Signaling Tec.	9101	anti-rabbit (Cell Signaling Tec)	1:2000 in Milch	Erk, gesamt
inhibitorisches G-Protein (G α_{i2})	1:2000 in TBST	Prof. Dr. med. M. Böhm, Universität Homburg/Saar		anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
stimulierendes G-Protein (G α_s)	1:200 in TBST	Santa Cruz Biotec.	sc-823	anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
MAPK p38, gesamt	1:1000 in Milch	Cell Signaling Tec.	9212	anti-rabbit (Cell Signaling Tec)	1:1000 in Milch	
Phospho-p38	1:1000 in Milch	Cell Signaling Tec.	9211	anti-rabbit (Cell Signaling Tec)	1:1000 in Milch	p38, gesamt
Phospholamban (PLB), gesamt	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds		anti-mouse	1:5000 in TBST	Calsequestrin
Phospho-Serin16-PLB (PS16)	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds		anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
Phospho-Threonin17-PLB	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds		anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
PPI-1	1:5000 in TBST	Eurogentic, Brüssel		anti-rabbit (Sigma)	1:10000 in Milch	Calsequestrin
anti-rabbit	in Milch	Cell Signaling Tec.	7074			
anti-rabbit	in Milch	Sigma	A-0545			
anti-mouse	in Milch	Sigma	A-3682			

Transferpuffer

Tris	3,025 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml

ad 1 l *Aqua destillata*.

Lagerung bei 4 °C.

10x TBS

Tris	242,3 g
NaCl	175,3 g

ad 2 l *Aqua destillata*.

pH mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Trockenmilch-Lösung

TBST	
Magermilchpulver	5%

ECL-Strip-Puffer

Tris HCl	4,925 g
β-Mercaptoethanol	3,49 ml
SDS	10,00 g

ad 500 ml *Aqua destillata*.

pH mit NaOH auf 6,7 eingestellt.

Ponceaurot S Lösung

Ponceaurot S	0,5 g
Essigsäure (100%)	1 ml

ad 100 ml *Aqua destillata*.

Durch Faltenfilter filtriert.

TBST

10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml

ad 1 l *Aqua destillata*.

2.5.2.4 Erfassung und Verarbeitung der Daten

Die belichteten Filme wurden digitalisiert (Durchlichtscanner Agfa Snapscan 600) und die Banden mittels Densitometrie quantifiziert (Auswertungssoftware MultiAnalyst, BioRad, München).

2.5.3 **Erfassung der mRNA-Konzentration**

Die Gesamt-RNA wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi [46] aus Monolayer Zellkulturen präpariert.

2.5.3.1 RNA-Extraktion

Zu 10^6 Zellen einer Monolayer Kultur wurde 500 µl TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben, 5 min inkubiert und anschließend kräftig gemixt. Zu den Homogenaten wurde 1/5 des Gesamtvolumens Chloroform hinzupipettiert, das Gemisch 45 s gevortext und für 3 min inkubiert. Zur Beschleunigung der Phasenauftrennung wurden die Proben für 15 min bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert. Die hydrophile RNA-haltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt mit äquivalentem Volumen eisgekühltem Isopropanol versetzt, gemischt und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12.000 g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentri-

fugiert (5 min, 4 °C, 12.000 g), der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 10 min bei 60 °C gelöst.

2.5.4 Erfassung der Serin/Threonin-Proteinphosphatase-1 Aktivität

Die Aktivität der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (PP) wurde analog der Beschreibung von Ahmad [3] und Neumann [175] gemessen. Die Methodik durfte ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster bei Privatdozent Dr. Peter Boknik und Professor Dr. Joachim Neumann erlernen.

2.5.4.1 Herstellung der Homogenate

Die Monolayer Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen und je 10^6 Zellen in 500 µl Homogenisationspuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann jeweils dreimal 15 s polytroniert und zehnmal mit einer G27 Kanüle aspiriert. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt (s. 2.5.1).

Homogenisationspuffer

Tris	315,2 mg
EGTA	76,08 mg
EDTA	186,12 mg
100 mM Benzamidine	1000 µl
50 mM PMSF	1000 µl
β-Mercaptoethanol	100 µl

ad 100 ml *Aqua destillata*.

pH wurde auf 7,4 eingestellt.

Zur Validierung des Versuchsaufbaus wurde die Aktivität kommerziell erworbener, rekombinanter Serin/Threonin-Proteinphosphatase in aufsteigender Konzentration, sowie die Auswirkung der PKA (0,1 U PKA in 6 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM ATP) in Zellhomogenaten untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die PP-Aktivität von rekombinantem PPI-1 untersucht, welches unphosphoryliert bzw. durch die PKA phosphoryliert in aufsteigender Konzentration zu Zellhomogenaten uninfizierter KMNR gegeben wurde. Das rekombinante PPI-1-Protein wurde 1:1 mit einem Reaktionsmix (6 nM $MgCl_2$, 0,1 mM ATP), welchem alternativ nichts oder 10 U PKA zugesetzt worden waren, gemischt. Anschließend wurde das Gemisch 1 h bei 37 °C inkubiert, 5 min bei 95 °C inaktiviert und auf Eis abgekühlt.

2.5.4.2 Herstellung des Substrates

Serin/Threonin-Proteinphosphatasen dephosphorylieren die Phosphorylase a zur inaktiven Phosphorylase b. Für die Messung wurde Phosphorylase b mittels Phosphorylase-Kinase unter Verwendung von γ - ^{32}P -ATP phosphoryliert und so in ^{32}P -markierte Phosphorylase a überführt [67; 3].

Phosphorylase b wurde in *Aqua ad iniectabilia* (Endkonzentration 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 1.000 IE Phosphorylase Kinase in 3 ml Mix 1 gelöst. Anschließend wurde die Inkubationslösung angesetzt. Zwei mCi γ - ^{32}P -ATP wurden mit 40 μl 0,1 M ATP (pH 7,4) gemischt, zur Inkubationslösung gegeben und bei 30 °C 3 h inkubiert. Um den Anteil an freiem ATP zu verringern, wurde die Phosphorylase a zweimal mit 6 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung 30 min auf Eis gefällt und 20 min bei 20.800 g und 4 °C (Centrifuge 5417 R) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 4 ml Dialysepuffer resuspendiert und in einen Dialyseschlauch überführt. Die Dialyse erfolgte gegen je 5 l Dialysepuffer zunächst für 6 dann für 12 h.

Inkubationslösung:

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	360 μl
1 M Tris-HCl, pH=7,4	200 μl
1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	80 μl
1,54 M β -Mercaptoethanol	80 μl
0,1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	40 μl
Phosphorylase b (= 20 mg)	2000 μl
Phosphorylase	
Kinase (\approx 200 IU)	1000 μl

Mix 1:

BSA	10 mg
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	9,5 ml
1 M Tris-HCL, pH 7,4	500 μl
β -Mercaptoethanol	100 μl

Dialyselösung:

1 M Tris-HCl, pH 7,4	50 ml
0,2 M EDTA, pH 7,4	25 ml

ad 5 l *Aqua ad iniectabilia*.

2.5.4.3 Messung der Phosphataseaktivität

Zur Messung der Phosphataseaktivität [175] wurden die Proben mit der γ - ^{32}P -markierten Phosphorylase a inkubiert und das dephosphorylierte γ - ^{32}P -Phosphat im β -Szintillationszähler quantitativ erfasst (s. Abb. 2.9). Durch Zusatz des Komplexbildners EDTA in der Phosphorylase a-Substratlösung konnten Einflüsse der calciumabhängigen PP2B und der magnesiumabhängigen PP2C weitgehend ausgeschlossen werden, es wurde jedoch nicht zwischen der PP1- und der PP2A-Aktivität differenziert.

Phosphorylase a-Substratlösung pro Ansatz:

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	10 µl
β-Mercaptoethanol (1 :20)	1 µl
50 mM Tris, pH 7,4	1 µl
10 mM EDTA, pH 7,4	0,5 µl
100 mM Coffein	2,5 µl
[³² P]-Phosphorylase a	5,0 µl

In einer Testmessung wurde die Menge an Homogenat der jeweiligen Bedingung bestimmt, bei der etwa 20% der eingebrachten Menge γ -[³²P]-Phosphorylase umgesetzt wurde, um für das Messergebnis eine hohe Proportionalität zu erreichen. Zur entsprechenden Probenmenge ad 30 µl Homogenisationspuffer wurde 20 µl Phosphorylase a-Substratlösung zugegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 50%iger Trichloressigsäure gestoppt, 30 µl Rinderserumalbumin (20 g/l in 0.1% Natriumazid) hinzugefügt und 10 min auf Eis gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (4 °C, 13.000 g, 5 min) sedimentiert und 70 µl des Überstandes im β-Szintillationszähler gemessen.

Bei jeder Messung wurden Gesamtradioaktivität (*total counts*), als Maß für die spezifische Radioaktivität, und die unspezifische Hintergrundradioaktivität (Leerwert) der Phosphorylase a-Lösung in 30 µl Homogenisationspuffer ermittelt. Da die Proteinbestimmung der Phosphorylase a-Lösung auf Grund fehlender technischer Möglichkeiten im Heißlabor nicht möglich war, wurden die ermittelten *Counts* pro Minute (CPM) auf die Menge an Protein in den Proben bezogen. Die Messung der PP-Aktivität erfolgte dreimal je Probe und der Mittelwert wurde für die weitere Auswertung verwendet. Da die Messung auf Grund der großen Probenanzahl in mehreren Tagen durchgeführt wurde und die Radioaktivität der eingesetzten heißen Phosphorylase a in dieser Zeit sank, wurden die Werte zusätzlich auf den Mittelwert, der in einem Durchlauf gemessenen Serien, normiert. Da die Zusammensetzung an unterschiedlich infizierten KMNR im Verhältnis immer gleich war und die so kalkulierten Werte das Verhältnis der PP-Aktivität unterschiedlich behandelte KMNR vor der Normierung wiedergaben, sollte dies eine geeignete Methode sein, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

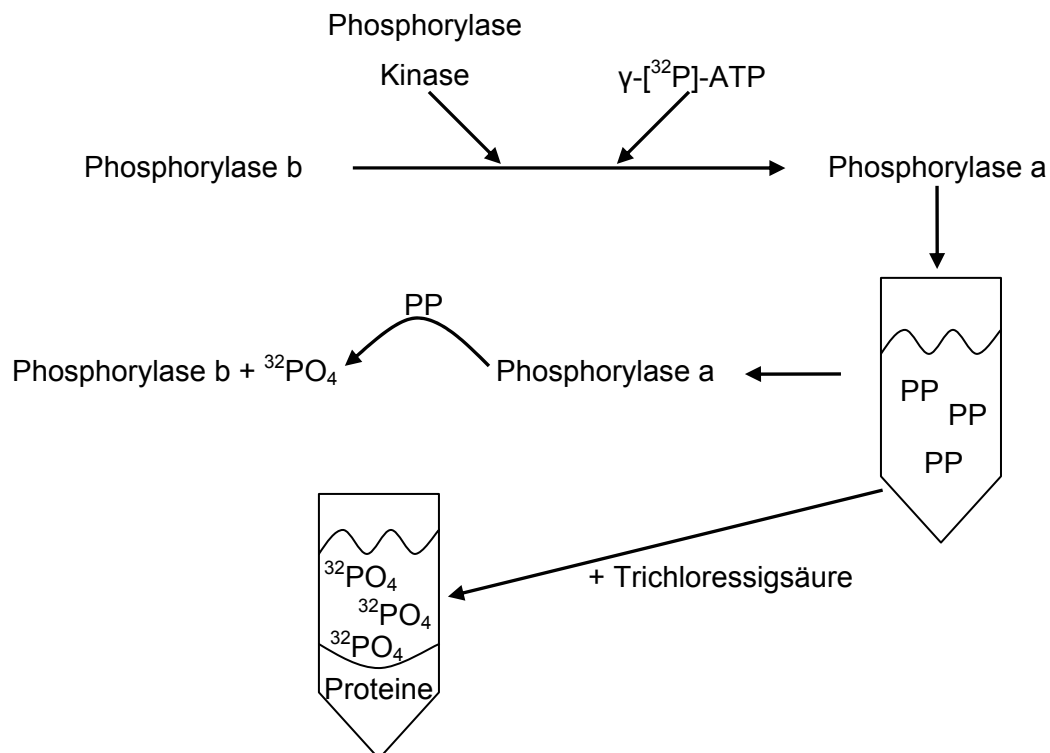


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des Prinzips der PP-Aktivitätsmessung.

Die Phosphorylase Kinase phosphoryliert Phosphorylase b mit γ -[³²P]-ATP zu Phosphorylase a. Phosphorylase a wird in standardisierter Konzentration den Proben zugegeben. Enthaltene Proben (PP) werden dephosphoryliert, wodurch Phosphorylase a und γ -[³²P]-Phosphat (³²PO₄) freigesetzt werden. Durch Zugabe von Trichloressigsäure werden die Proteine gefällt und abzentrifugiert. Im Überstand verbleibt das freie ³²PO₄, das mit einem β -Szintillationszähler quantitativ erfasst wird und mit der PP-Aktivität der gemessenen Probe korreliert.

2.5.5 cAMP Akkumulation

Zur Erfassung der cAMP-Bildung in KMNR unter basalen Bedingungen, nach β -adrenerger Stimulation (mit Isoprenalin) und nach direkter Stimulation der Adenylylcyclase (mit Forskolin), wurde der Abbau von cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterasen mittels des unspezifischen Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma, Taufkirchen) unterbunden. Mit einem Immunoassay konnte akkumuliertes cAMP, das durch Lyse mit HCl aus den KMNR freigesetzt wurde, gemessen werden.

2.5.5.1 Probenverarbeitung

Pro Messpunkt wurden 10⁶ KMNR untersucht. Die cAMP Akkumulation wurde in serumfreiem Assay-Medium durchgeführt, das zur Pufferung eines neutralen pH-Wertes 20 mM HEPES in Minimal essential medium (Earle MEM) enthielt.

Die Bestimmung erfolgte analog den Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden). Initial wurde das KM-Medium durch Assaymedium ersetzt, das IBMX zur Hemmung des cAMP-Abbaus und Ascorbinsäure als Antioxidans enthielt.

2.5.5.2 Quantifizierung des gebildeten cAMPs

Zur Bestimmung von cAMP wurde der *Cyclic AMP (low pH) Immunoassay* (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet, dessen Funktionsprinzip in Abb. 2.10 schematisch dargestellt ist.

Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde die Absorption mittels des ELISA Readers Spectra Rainbow (Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration in der Probe. Zur Angleichung sich unterscheidender Absolutwerte in den verschiedenen Serien wurden die Werte auf die Mittelwerte der maximal erreichbaren (forskolingetriggerten) cAMP Akkumulation jeder Infektionsbedingung bezogen.

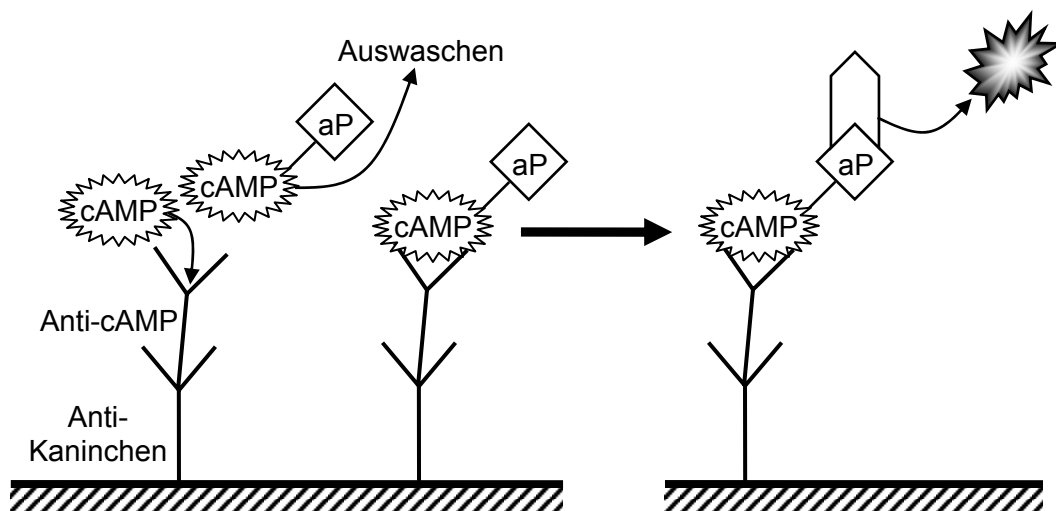


Abb. 2.10: Prinzip des cAMP Immunoassays.

Das cAMP aus den zugegebenen Kardiomyozyten verdrängt das Konjugat aus cAMP und alkalischer Phosphatase (aP) vom Antikörper. Das so gelöste Konjugat wird ausgewaschen und dem verbleibenden gebundenen Konjugat ein Substrat für die alkalische Phosphatase zugeführt, die das Substrat in einen Farbstoff umwandelt.

2.6 Immunzytochemie

2.6.1 Immunologische Markierung der KMNR

Zur immunzytochemischen Färbung wurden KMNR auf gelatinebeschichteten Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und 15 min in 4% Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) fixiert. Anschließend wurde mit TBS gewaschen und 30 min in Blocklösung inkubiert, wodurch die Zellen permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt wurden. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-Ratte- α -Aktinin IgG der Maus (1:800 in BSA-Lösung) für 1 h, dreimaliges Waschen mit TBS und 30 min Inkubation mit cy3-markiertem Anti-Maus IgG der Ziege (1:1000 in BSA-Lösung). Vor dem Eindeckeln in Mowiol wurde dreimal mit TBS gewaschen.

Blocklösung:

Triton-X 100	0,2%
BSA	5%
in TBS (siehe 2.5.2.3)	

BSA-Lösung:

BSA	5%
in TBS	

Mowiol

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6,0 g
<i>Aqua destillata</i>	6 ml
0,2 M Tris-HCl, pH 8,5	12 ml

2.6.2 Quantitative Bestimmung morphologischer Parameter

Durch die Markierung von α -sarcomerischem Actinin mit einem cy3-gekoppeltem Antikörper werden die KMNR im konfokalen Lasermikroskop (LSM; Axiovert, Carl Zeiss, Jena) gut sichtbar. Durch Umrandung der einzelnen Zellen kann mit Hilfe eines, von Zeiss bereitgestellten Programms (Zeiss LSM Image Browser, Version 3,1,0,99, Zeiss, Jena), der Umfang und die Querschnittsfläche der KMNR bestimmt werden.

2.7 Statistik

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechnet aus den Einzelwerten (n), angegeben. Die EC₅₀-Werte für Isoprenalin wurden durch Berechnung einer sigmoidalen Regressionskurve aus den Messwerten für jedes EHT und mathematischer Ermittlung der EC₅₀ für jede Einzelkurve bestimmt. Bei der Bestimmung der cAMP Akkumulation wurde aus den einzelnen Messpunkten, d.h. den einzelnen Kulturschalen, durch sigmoidale Regression eine gemittelte Kurve errechnet, aus der die EC₅₀ ermittelt wurde. Die statistische Signifikanz wurde mittels *student's t-test* (beim Vergleich zweier Gruppen) bzw. dem ANOVA-Test und anschließend *post hoc* Test nach Bonferoni (beim Vergleich mehrerer Gruppen) mit dem Programm Prism3 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA) ermittelt. Unterschieden sich die Varianzen zwischen den Gruppen signifikant, wurde entsprechend der Mann-Whitney-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Test angewendet. Der Vergleich der EC₅₀ erfolgte mittels *student's t-test* bzw. dem Mann-Whitney-Test. Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei den Kontraktionsmessungen erfolgte durch ANOVA für wiederholte Messungen mittels StatView-Software (SAS; Cary, NC, USA). Hierbei wurde bei der Relaxationszeit der absolute Einfluss der Intervention verglichen, während bei allen weiteren Parametern die Beeinflussung der Reaktion auf Calcium bzw. Isoprenalin betrachtet wurde. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Ergebnisse

3.1.1 Sequenzierung des kardialen PPI-1 von Mensch und Ratte

Aus mRNA gewonnene cDNA von PPI-1 aus der Herz- und Skelettmuskulatur von Ratten, sowie aus der Herzmuskulatur von Menschen wurde sequenziert und im Agarosegel aufgetrennt (s. Kap. 2.1.1 und 2.1.2). Die Separation im Agarosegel ergab klare Banden bei der zu erwartenden Größe von etwa 500 Basenpaaren (b) (s. Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Präparatives Agarosegel zur Separation von PPI-1 cDNA.

500 b gibt die Höhe des 500 Basenpaare umfassenden DNA-Fragments der mitgeführten DNA-Leiter wieder.

Die anschließend durchgeführte zyklische Sequenzierung mit der aufgereinigten cDNA (s. Kap. 2.1.3) deckte den Austausch eines Basenpaares im kardialen PPI-1 der Ratte auf. An Stelle von Guanin⁸⁵ ist in der Sequenz der Rattenherzen Adenin eingebaut, welches den Austausch von Glutamat²⁷ durch Lysin bewirkt (s. Abb. 3.2). Erstaunlicherweise zeigte sich dies nur im Herzen der Ratte, während die gewonnene cDNA von PPI-1 aus dem Myokard von Menschen mit der PPI-1-Sequenz aus dem menschlichen Gehirn [83] und die aus der Skelettmuskulatur der Ratten mit der hierzu veröffentlichten Sequenz [82] übereinstimmt.

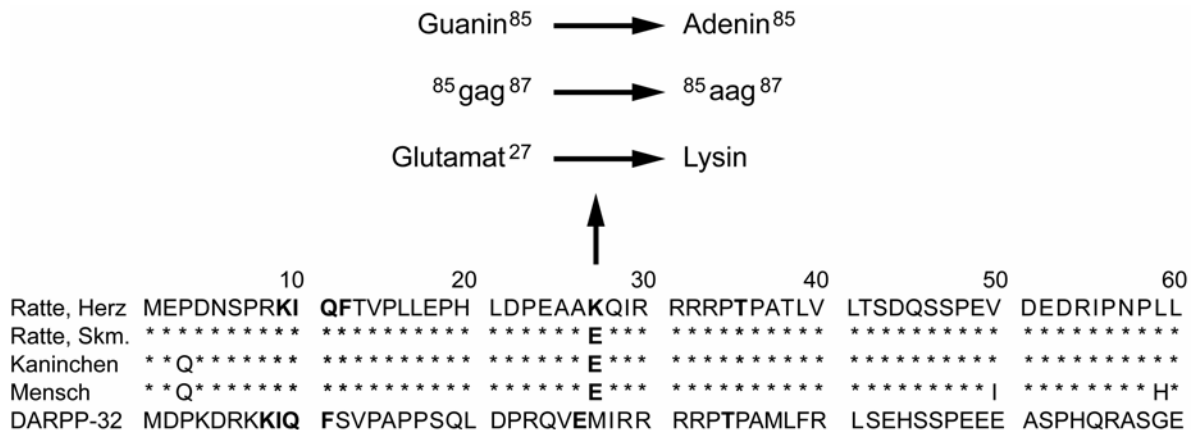


Abb. 3.2: Gegenüberstellung von PPI-1-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies und Gewebe.

Darstellung der in dieser Arbeit auf Grund der Sequenzanalyse der cDNA von PPI-1 aus dem Herzgewebe der Ratte postulierten Aminosäuresequenz. Zum Vergleich sind die bereits veröffentlichten Aminosäuresequenzen von PPI-1 der Skelettmuskulatur der Ratte (Ratte, Skm., [82], *Nucleotides Accession number* der PubMed [196] J05592), der Skelettmuskulatur des Kaninchens (Kaninchen, [4], *Protein Accession number* der PubMed [197] P01099), des menschlichen Gehirns (Mensch, [83], *Nucleotides Accession number* der PubMed [196] U48707) und des Strukturhomologs von PPI-1, des Dopamin- und cAMP-regulierten Phosphoproteins mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, ebenfalls aus dem menschlichen Gehirn (DARPP-32, [31], *Protein Accession number* der PubMed [197] Q9UD71), dargestellt.

In weiteren Untersuchungen von Gewebeproben menschlicher Herzen „gesunder“ Spender, sowie Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie konnten ebenfalls klare PPI-1-Banden im Agarosegel separiert werden (s. Abb. 3.3). Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass die Sequenz im menschlichen Herzen keinen Basenaustausch aufweist, so dass der Austausch von Guanin⁸⁵ durch Adenin offenbar nur im Myokard der Ratte vorkommt.

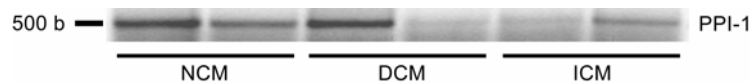


Abb. 3.3: Agarosegel zur Separation von PPI-1 cDNA menschlicher Herzen.

Das Gel zeigt die PPI-1 Banden aus dem Myokard von Menschen ohne Kardiomyopathie (NCM), mit dilatativer (DCM) oder ischämischer Kardiomyopathie (ICM). 500 b gibt die Höhe des 500 Basenpaare umfassenden DNA-Fragments der mitgeführten DNA-Leiter wieder.

3.1.2 Herstellung der Adenoviren und die Effizienz des Gentransfers

3.1.2.1 Ergebnisse der Generierung

Im trunkierten, konstitutiv aktiven PPI-1 (PPI-1_(-1-65, T35D)) wurden Adenin¹⁰³ und Cytosin¹⁰⁴ durch Guanin und Adenin ersetzt, so dass an Stelle von Threonin³⁵ (kodiert durch acc) später Aspartat (kodiert durch gac) eingebaut wurde (s. Kap. 2.2.1.1). Der Basenaustausch erfolgte durch einen vorwärts- und einen rückwärtslaufenden Primer, die sich etwas überlappen und inmitten der PPI-1-cDNA ansetzen. Dadurch werden bei erfolgreichem Basenaustausch überwiegend zwei DNA-Fragmente, ein N- und ein C-terminales, amplifiziert. Diese DNA-Fragmente mit einer Länge von 126 bzw. 421 Basenpaaren konnten in einem präparativen Agarosegel nachgewiesen und aufgetrennt werden (s. Abb. 3.4).

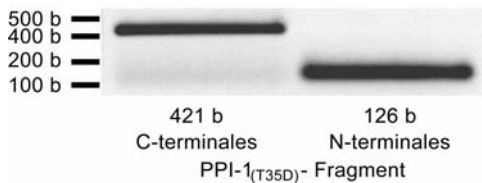


Abb. 3.4: C- und N-terminale PPI-1_(T35D)-Fragmente - separiert im Agarosegel.

Die Skala links gibt die Höhe der DNA-Fragmente der mitgeführten DNA-Leiter in Basenpaaren (b) wieder.

Anschließend wurden die aus dem Agarosegel eluierten DNA-Fragmente fusioniert und trunkiert (s. Kap. 2.2.1.2). Die cDNA des trunkierten, konstitutiv aktiven PPI-1_(-1-65, T35D) sollte hierbei in der Mehrzahl der Durchgänge amplifiziert werden. Sie bildet dadurch die stärkste Bande bei etwa 200 Basenpaaren (s. Abb. 3.5).

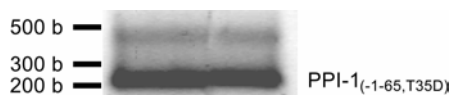


Abb. 3.5: PPI-1_(-1-65, T35D)-DNA im Agarosegel.

Die Skala links gibt die Höhe der DNA-Fragmente der mitgeführten DNA-Leiter in Basenpaaren (b) wieder. Auf Höhe von 500 b ist auch die Bande des C-terminalen 421 b umfassenden PPI-1_(T35D)-Fragments erkennbar.

Nachdem die PPI-1-cDNA mit plngo, die PPI-1_(-1-65, T35D)-cDNA mit pAdTrack-CMV ligiert und das Ligationsprodukt in Bakterien vermehrt worden war, erfolgte die Überprüfung des erfolgreichen Einbaus im Agarosegel (s. Kap. 2.2.2). Bei erfolgreicher Ligation der PPI-1-cDNA in plngo sind nach Verdau mit Nde I zwei Fragmente mit einer Länge von 3.600 und 4.600 Basenpaaren zu erwarten, während bei nicht erfolgter Ligation oder bei Verdau von plngo das längere Stück nur 4.000 Basenpaare misst (s. auch Tab. 2.8 und Abb. 3.6).

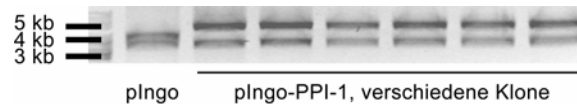


Abb. 3.6: Nde I-Verdau von plngo und sechs positiv ligierte Klone plngo-PPI-1 im Agarosegel.

Die Skala links gibt die Höhe der DNA-Fragmente der mitgeführten DNA-Leiter in Kilobasenpaaren (kb) wieder.

Das Plasmid pAdTrack-CMV wird durch Nde I in drei Teile mit einer Länge von 4.600, 3.700, und 1.000 Basenpaaren geschnitten. Beim Einbau von PPI-1_(-1-65, T35D) verlängert sich das kleinste Stück um 200 Basenpaare auf 1.200 (s. auch Tab. 2.8 und Abb. 3.7). Die Sequenzierung der cDNA der im Agarosegel als PPI-1 und von PPI-1_(-1-65, T35D) positiv erkannten Klone bestätigte den Einbau der richtigen cDNA.

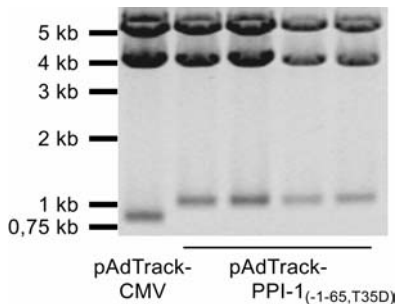


Abb. 3.7: pAdTrack-CMV und vier positiv ligierte Klone pAdTrack-PPI-1_(-1-65, T35D).

Die Skala links gibt die Höhe der DNA-Fragmente der mitgeführten DNA-Leiter in Kilobasenpaaren (kb) wieder.

Die Ligationen wurden mit pAdEasy-1 rekombiniert und mit Nde I und Pac I verdaut. Die erfolgreiche Rekombination wurde durch das Bandenmuster im Agarosegel (vgl. Tabelle 2.8) verifiziert (s. Abb. 3.8).

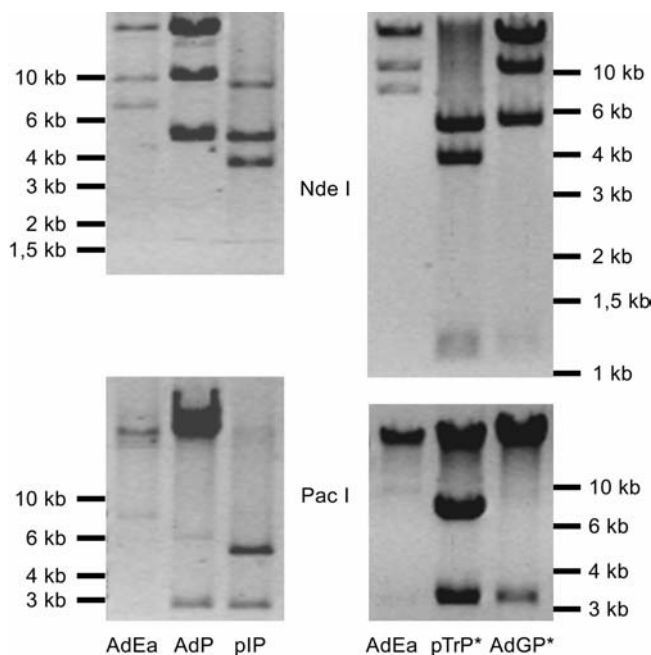


Abb. 3.8: Verdau der Plasmide vor und nach Rekombination im Agarosegel.

Die zur Rekombination eingesetzten Plasmide AdEasy-1 (AdEa) mit plngo-PPI-1 (pIP) bzw. pAdTrack-PPI-1_(-1-65, T35D) (pTrP*), sowie die positiven Rekombinationen AdPPI-1 (AdP) und AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) (AdGP*) wurden mit Nde I und Pac I verdaut und die Reaktionsansätze im Agarosegel aufgetrennt. Die hier zu sehenden Banden entsprechen denjenigen, die bei erfolgreicher Rekombination zu erwarten waren.

Die positiven Rekombinationen wurden linearisiert und die gefällte DNA in HEK 293-Zellen transfiziert (s. Kap. 2.2.3). Nach Präparation hochtitriger Virussuspensionen, wurde aus diesen DNA extrahiert und die Konzentration der biologisch aktiven Viren errechnet. Zudem wurden aufsteigende Konzentrationen der gefalteten Adenoviren-DNA im Agarosegel mit den Banden des linearisierten AdEasy-1 (s. Abb. 3.9) oder geschnittener λ -Phagen-DNA (s. Abb. 3.10) verglichen. Da die Adenoviren, AdEasy-1 und auch das größte Schnittstück der mit Eco0109 I verdauten λ -Phagen-DNA in etwa gleich lang sind, sollten die Banden jeweils gleicher Konzentration auch etwa gleich stark sein. Diese Übereinstimmung konnte bei den generierten Viren stets nachgewiesen werden.

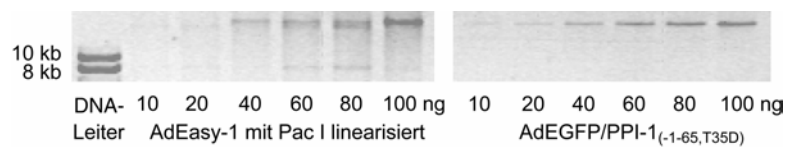


Abb. 3.9: Größenvergleich der DNA-Banden von AdEasy-1 mit äquivalenten Konzentrationen von AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D).

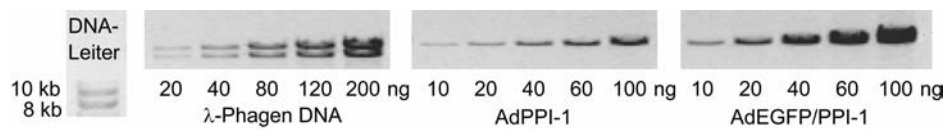


Abb. 3.10: Größenvergleich der DNA-Banden von λ -Phagen mit entsprechenden Konzentrationen von AdPPI-1 und AdEGFP/PPI-1.

3.1.2.2 Effizienz der PPI-1 Überexpression in Monolayer Zellkulturen

Die Effizienz der adenoviralen Proteinüberexpression wurde in kultivierten Kardiomyozyten neonateler Ratten (KMNR) überprüft, in denen auch die weiteren Experimente stattfinden sollten. Bei EGFP-koexprimierenden Adenoviren wurde definiert, dass nach 48 h Infektion jede Zelle die ein Viruspartikel inokuliert hat grün leuchtet. Dies bedeutet, dass die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI) eins wäre. Je nach Zellzahl und applizierter Virusmenge, bei der dies eintrat, wurde die Anzahl der biologisch aktiven Viren neu kalkuliert und für die weiteren Experimente beibehalten (s. Abb. 3.11).

Die Darstellung der Virustitrationen im Immunoblot mittels eines PPI-1-Antikörpers und Calsequestrin als Ladekontrolle zeigte eine MOI-abhängige Steigerung der PPI-1-Proteinüberexpression in KMNR. Exemplarisch sind in Abbildung 3.12 die Bilder des Laser Scanning Mikroskops einer engmaschigen AdEGFP/PPI-1-Titration dargestellt. Abbildung 3.13 zeigt den dazugehörigen Western Blot und dessen densitometrische Auswertung. Hier lässt sich erkennen, dass der optische Eindruck des Fluoreszenzgrades gut mit der PPI-1-Proteinüberexpression korreliert. Die über die Fluoreszenz bestimmte MOI von eins entspricht densitometrisch einer relativen PPI-1-Konzentration von 64, eine MOI von zwei 117, also in etwa das Doppelte. Bei einer MOI von zwei wurde wohl das Maximum der für die Zelle möglichen Proteinbiosynthese erreicht, da bei höheren Viruskonzentrationen die PPI-1-Proteinüberexpression ein Plateau erreichte. Die Stärke der grünen Fluoreszenz war somit ein geeigneter Marker zur Abschätzung der PPI-1-Proteinüberexpression.

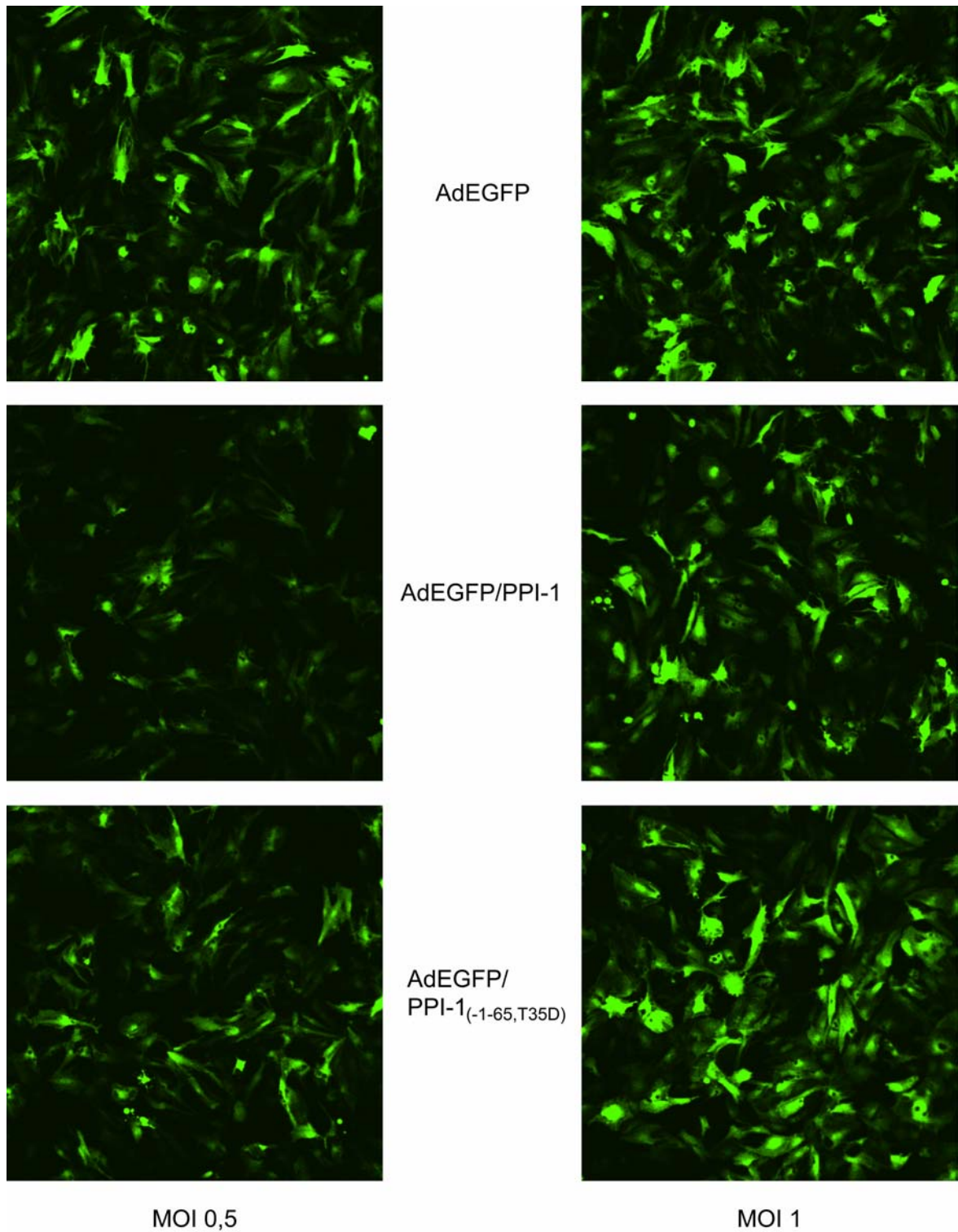


Abb. 3.11: Virustitration auf KMNR 48 h nach der Infektion.

Die Multiplizität der Infektion (MOI) wurde nach 48 h definiert. Bei derjenigen Viruskonzentration, bei der gerade jede Zelle grün leuchtet, erhielt sie den Wert eins. Hier sind KMNR dargestellt, die mit einer MOI von 0,5 bzw. 1 infiziert wurden.

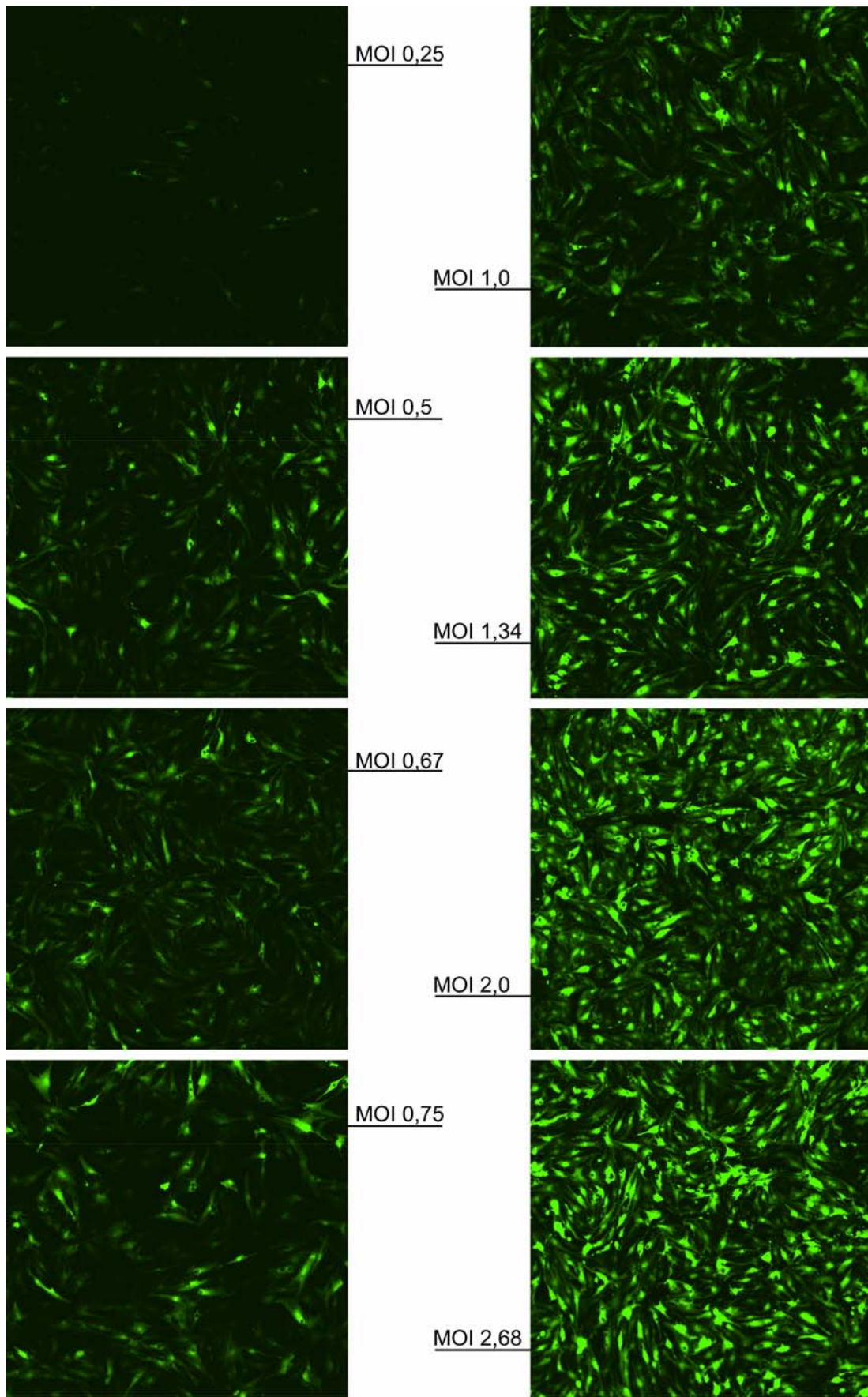


Abb. 3.12: AdEGFP/PPI-1 Virustitration in KMR 48 h nach der Infektion.

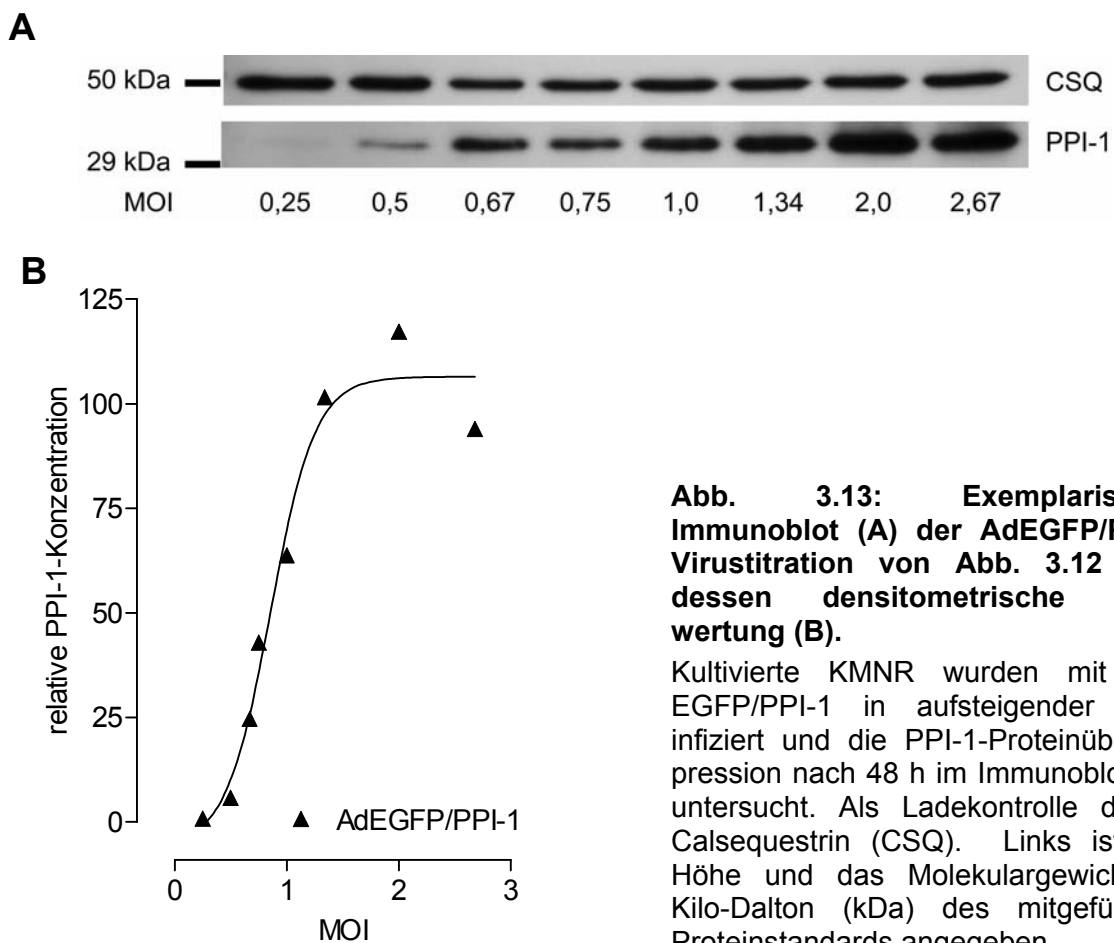


Abb. 3.13: Exemplarischer Immunoblot (A) der AdEGFP/PPI-1 Virustitration von Abb. 3.12 und dessen densitometrische Auswertung (B).

Kultivierte KMNR wurden mit Ad-EGFP/PPI-1 in aufsteigender MOI infiziert und die PPI-1-Proteinüberexpression nach 48 h im Immunoblot (A) untersucht. Als Ladekontrolle diente Calsequestrin (CSQ). Links ist die Höhe und das Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa) des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

Im Weiteren konnte auch eine zeitabhängige Steigerung der PPI-1-Proteinüberexpression in KMNR gezeigt werden. Abbildung 3.14 zeigt den starken Fluoreszenzunterschied Ad-EGFP/PPI-1-infizierter KMNR 24 bzw. 48 h nach Infektion mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen. In einer weiteren Versuchsreihe wurden KMNR mit einer MOI von eins infiziert und 6, 12, 24 oder 48 h inkubiert. Die Untersuchung im Immunoblot (s. Abb. 3.15) zeigte, dass endogenes PPI-1 nur in äußerst geringer Konzentration vorhanden ist, da 6 h nach der Infektion mit AdEGFP/PPI-1 keine Bande erkennbar wird. Nach 12 h war eine deutliche Bande erkennbar, die sich nach 24 h verdreifacht und nach 48 h verfünffacht hatte (s. Abb. 3.15).

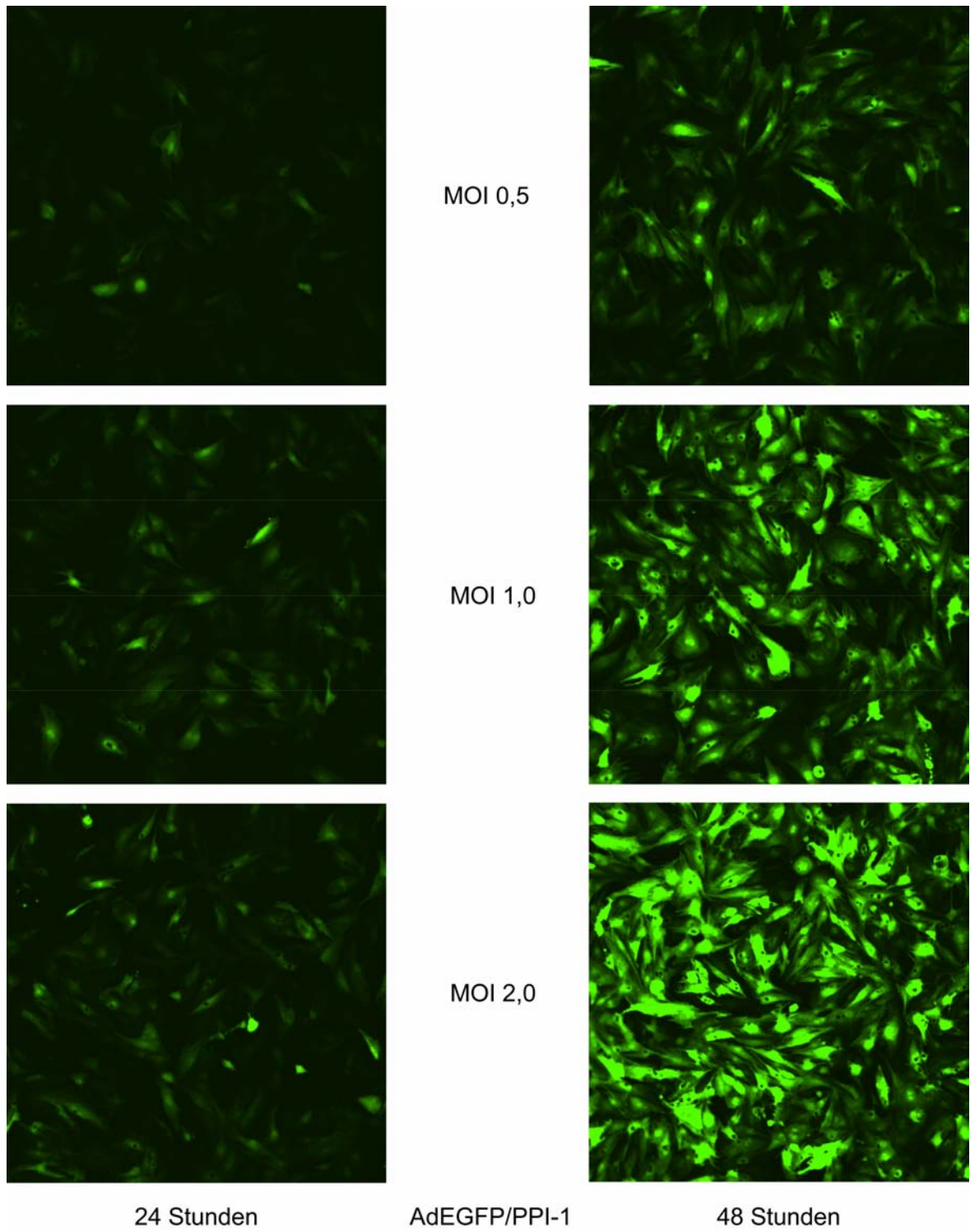


Abb. 3.14: AdEGFP/PPI-1-Virustitration 24 und 48 h nach der Infektion.

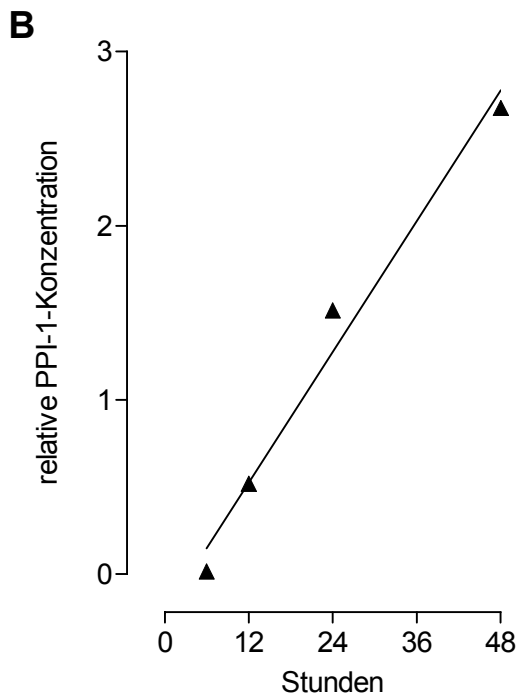
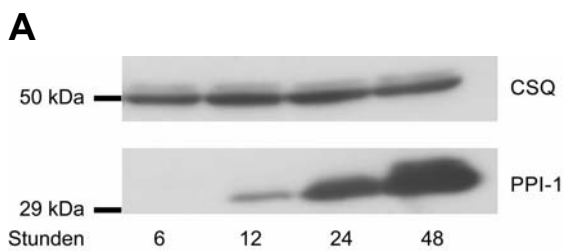


Abb. 3.15: Exemplarischer Immunoblot der zeitabhängigen PPI-1-Proteinüberexpression (Vgl. Abb 3.14) und dessen densitometrische Auswertung.

KMNR wurden an Tag vier mit einer MOI von eins infiziert, nach 6, 12, 24 oder 48 h geerntet und die PPI-1-Proteinüberexpression im Immunoblot ausgewertet. Als Ladekontrolle diente Calsequestrin (CSQ). Links ist die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung des Blots.

Das trunkierte, konstitutiv aktive Protein PPI-1_(-1-65, T35D) konnte in diesen Testreihen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Der polyklonale PPI-1-Antikörper wurde gegen das PPI-1 in seiner gesamten Länge entwickelt. Es ist uns nicht genau bekannt, welche Peptide der Antikörper erkennt, so dass der Nachweis von PPI-1_(-1-65, T35D) durch den uns zur Verfügung stehenden Antikörper wohl durch die Verkürzung des Proteins nicht gelang. Die Sequenzierung von PPI-1_(-1-65, T35D) im Transfervektor pAdTrack-CMV ergab den Einbau der richtigen Sequenz, und die mit AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) infizierten KMNR zeigten die durch EGFP hervorgerufene Epifluoreszenz, so dass von einem korrekten Einbau und der entsprechenden PPI-1_(-1-65, T35D)-Proteinüberexpression in den infizierten Zellen ausgegangen wurde.

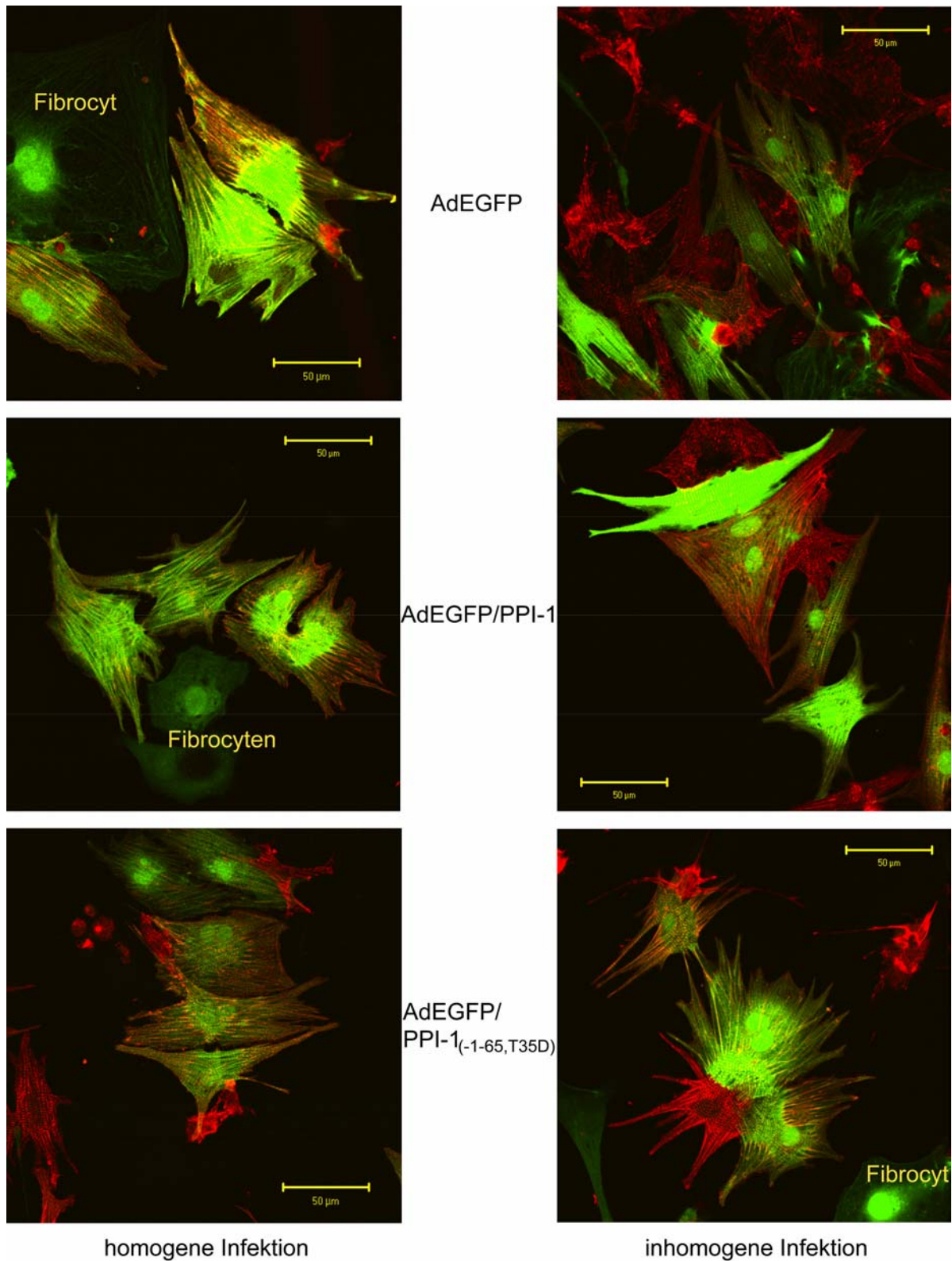


Abb. 3.16: Infektionshomogenität der KMNR in der Immunzytologie.

Die EGFP überexprimierenden Zellen erscheinen grün, das α -Aktinin der Myofilamente kommt rot zur Darstellung. Der Maßstab entspricht einer Länge von 50 μm .

Um die Infektionshomogenität genauer zu untersuchen, wurde die Fluoreszenz der KMNR nach immunzytologischer Markierung im konfokalen Lasermikroskop betrachtet. In zwei Serien wurden an Tag 4 jeweils fünf Schalen mit AdEGFP, AdEGFP/PPI-1 oder AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) mit einer MOI von zwei infiziert. Nach 48 h wurden die KMNR mit einem Antikörper gegen α -Aktinin, das in den Z-Banden der Myofilamente lokalisiert ist, und anschließend mit einem rot fluoreszierenden Sekundäntikörper gekoppelt ist, inkubiert. Hierbei konnte teils eine sehr schöne, homogene Infektion gezeigt werden, vielfach fiel jedoch auch eine äußerst inhomogene Verteilung der grünen Fluoreszenz auf (s. Abb. 3.16), die trotz Vorverdünnung der Virussuspension in Medium und schwenken der Kulturschalen nicht zu vermeiden war.

3.1.2.3 Effizienz der PPI-1-Proteinüberexpression in EHTs

Da ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit die Untersuchung der Effekte einer Proteinüberexpression von PPI-1 in rekonstituiertem Herzgewebe (engineered heart tissue, EHT) auf die Kontraktilität war, wurde auch die Effizienz der adenoviralen Proteinüberexpression in EHTs untersucht.

Hier konnte zunächst die konzentrationsabhängige Steigerung der grünen Fluoreszenz in EHTs gezeigt werden (s. Abb. 3.17). EHTs wurden an Tag 11 mit AdEGFP/PPI-1 der angegebenen MOI infiziert und die Effizienz mit Hilfe des koexprimierten EGFP 48 h später optisch dargestellt. Die Korrelation zwischen PPI-1-Proteinüberexpression und der applizierten MOI konnte im Immunoblot bestätigt werden (s. Abb. 3.18). Der adenovirale Gentransfer eignet sich somit gut für die Anwendung in EHTs und die EGFP-Fluoreszenz konnte auch in den EHTs als ein guter optischer Indikator für das Maß der Infektion eingesetzt werden.

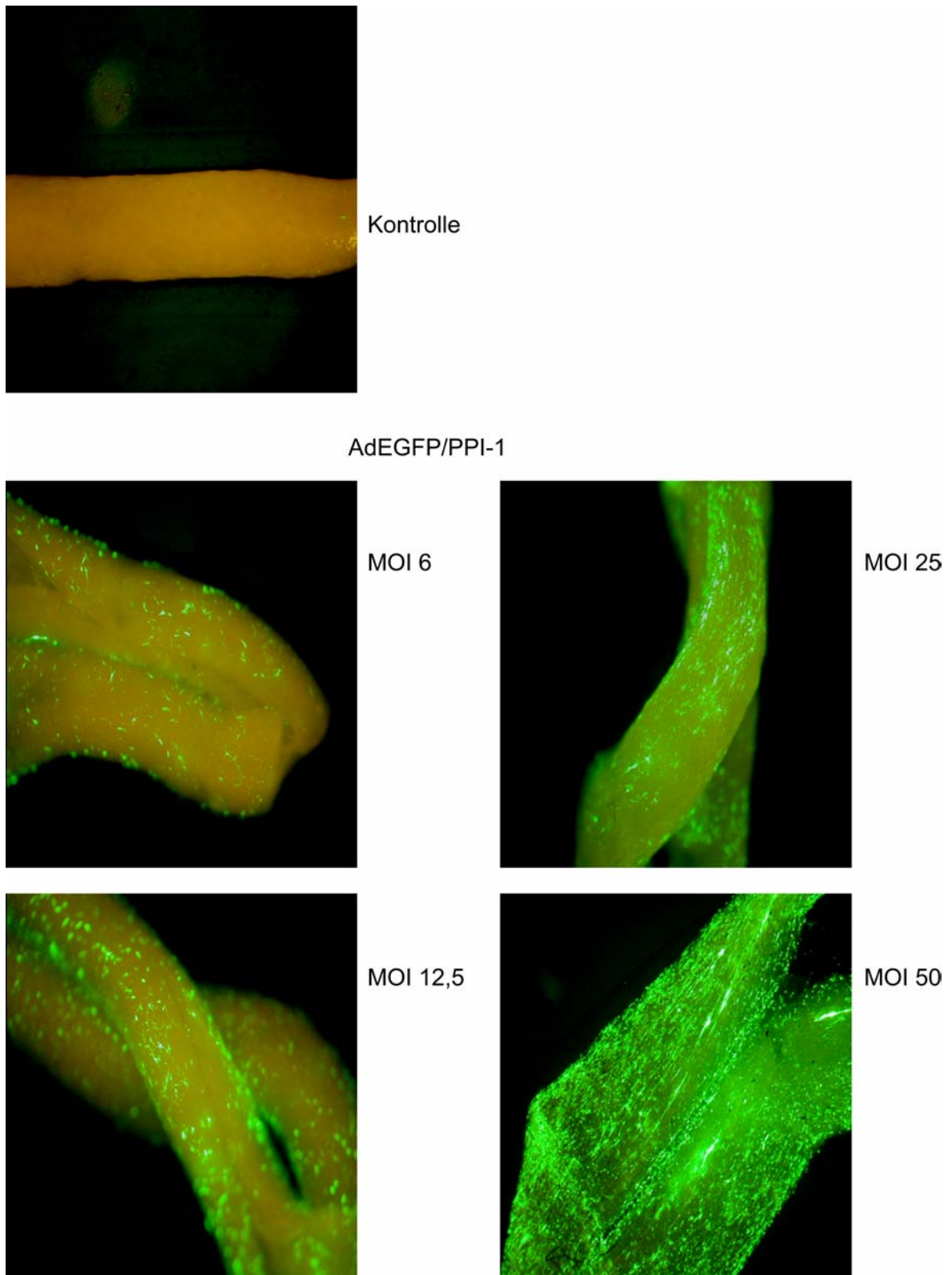


Abb. 3.17: AdEGFP/PPI-1-Virustitration in EHTs 48 h nach der Infektion.

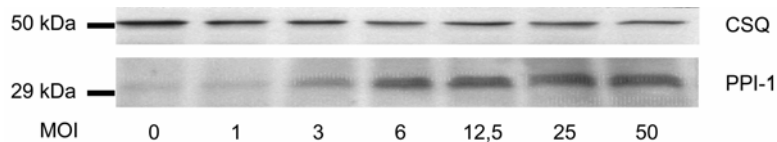


Abb. 3.18: PPI-1-Überexpression der AdEGFP/PPI-1 infizierten EHTs aus Abb. 3.17.

Der Immunoblot zeigt die PPI-1 Konzentration in EHTs, die mit AdEGFP/PPI-1 steigender MOI infiziert wurden. Als Ladekontrolle diente Calsequestrin (CSQ). Links sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

3.1.2.4 Effizienz der PKA-Phosphorylierung des PPI-1 durch Isoprenalin

Da die Phosphorylierung des überexprimierten PPI-1 in den Kardiomyozyten für die Untersuchung der Funktion des Proteins essentiell ist, wurde dies mit einem phosphospezifischen Antikörper, der gegen ein kurzes Phosphopeptid gerichtet ist, [218], untersucht.

Im Immunoblot wurde der Grad der Phosphorylierung von PPI-1 an Threonin³⁵ ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung basal relativ schwach ausgeprägt war, nach Stimulation mit 1 nM Isoprenalin jedoch stark anstieg (s. Abb. 3.19).

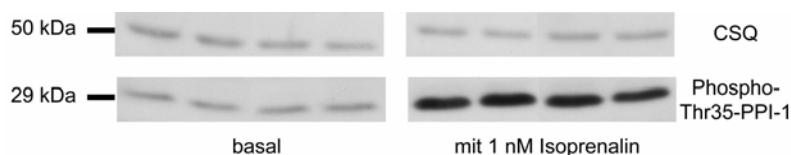


Abb. 3.19: PPI-1-Phosphorylierung an Threonin³⁵ nach Isoprenalinstimulation.

KMNR aus jeweils vier Zellkulturschalen wurden unstimuliert bzw. nach fünfminütiger Isoprenalinstimulation geerntet. Als Ladekontrolle diente Calsequestrin (CSQ). Links ist die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

3.1.2.5 Biologische Aktivität von adenoviral überexprimiertem und von rekombinantem PPI-1

Nachdem die adenovirale Proteinüberexpression von PPI-1 in kultivierten KMNR und die Phosphorylierbarkeit dieses Proteins gezeigt wurde, sollte auch die biologische Aktivität durch die Messung der Proteinphosphatase (PP)-Aktivität untersucht werden.

Zunächst wurde die PP-Aktivität nach Zugabe aufsteigender Konzentrationen rekombinanter PP1 bestimmt. Die gemessene PP-Aktivität stieg wie erwartet mit steigender PP1-Konzentration an (s. Abb. 3.20A).

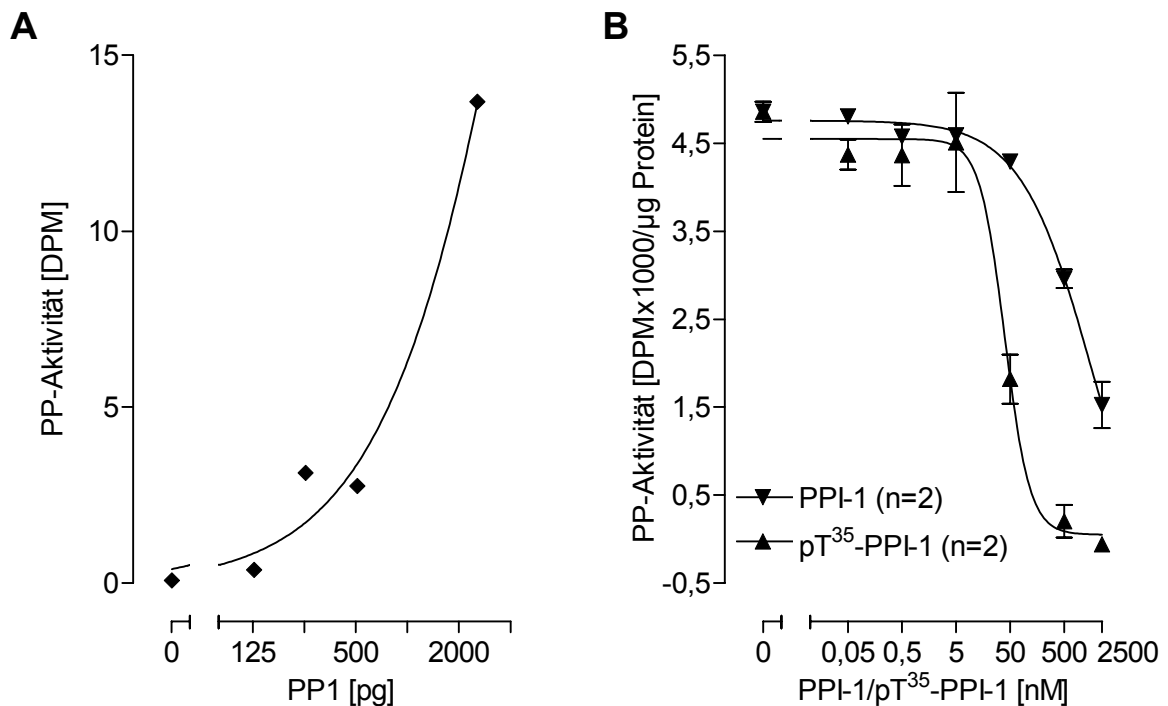


Abb. 3.20: PP-Aktivität aufsteigender Konzentrationen von rekombinanter PP1 (A) und unter Einfluss von rekombinantem PPI-1, sowie Phospho-Threonin³⁵-PPI-1 (B) in Kardiomyozytenhomogenaten.

(A) Ordinate: PP-Aktivität in radioaktiven Zerfällen pro Minute (DPM). Abszisse: zugegebene Konzentration an PP1 in Pikogramm. In B wurde Kardiomyozytenhomogenaten aufsteigende Konzentrationen unphosphoryliertem als auch an Threonin³⁵ phosphoryliertem PPI-1 (pT³⁵-PPI-1) zugegeben und deren PP1- und PP2A-Aktivität gemessen. Ordinate: PP-Aktivität in 1/1000 radioaktiven Zerfällen pro Minute (DPM) und µg Protein der Zellhomogenate. Abszisse: Zugegebene Konzentration an PPI-1 bzw. pT³⁵-PPI-1 in Nanomolar.

Es wurde der Einfluss von unphosphoryliertem, sowie an Threonin³⁵ phosphoryliertem, rekombinantem PPI-1 in Homogenaten von unbehandelten KMNR auf die PP-Aktivität untersucht. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der PP-Aktivität sowohl durch den phosphorylierten als auch durch den unphosphorylierten PPI-1 beobachtet. Die benötigte PPI-1-Konzentration zur halbmaximalen Hemmung (IC₅₀) der PP-Aktivität be-

zogen auf den Proteingehalt des Kardiomyozytenhomogenats war jedoch bei dem, durch die PKA phosphorylierten PPI-1 (pT^{35} -PPI-1) 40 nM und bei dem unphosphoryliertem PPI-1 1731 nM (s. Abb. 3.20B).

Anschließend wurde die PP-Aktivität in Homogenaten von KMNR, die EGFP, EGFP und PPI-1, sowie EGFP und PPI-1_(-1-65, T35D) adenoviral überexprimierten sowie in Kontrollen untersucht. Es wurden KMNR aus drei verschiedenen Zellpräparationen, insgesamt je 20 Zellkulturschalen, untersucht. In einer der Serien wurden zusätzlich je sechs Zellkulturschalen mit β -Galactosidase bzw. PPI-1 überexprimierenden KMNR untersucht. Jeweils die Hälfte der KMNR wurde fünf Minuten mit 1 nM Isoprenalin stimuliert. Zuvor wurde die Infektion von den EGFP überexprimierenden KMNR am Mikroskop bestätigt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt: (1) Es konnte dabei in keiner der Serien ein signifikanter Einfluss der Isoprenalinstimulation beobachtet werden (s. Abb. 3.21). (2) Indes wurde eine Steigerung der PP-Aktivität in EGFP-überexprimierenden KMNR im Vergleich zu uninfizierten KMNR beobachtet (s. Abb. 3.21). (3) Eine deutliche Erhöhung der PP-Aktivität zeigten die Homogenate der AdEGFP/PPI-1-infizierten KMNR (s. Abb. 3.21). Diese unerwartete Erhöhung zeigte sich sowohl gegenüber den uninfizierten KMNR (Kontrollen) als auch EGFP-überexprimierenden KMNR. (4) Unerwartet war auch der Effekt von PPI-1_(-1-65, T35D) – hier zeigte die gepoolte Auswertung keinen Einfluss auf die PP-Aktivität (s. Abb. 3.21). Es konnte jedoch in der Messung der einzelnen Zellpräparationen in zwei Serien eine Hemmung der PP-Aktivität um ein Drittel bis zur Hälfte beobachtet werden. In der dritten Serie hingegen bewirkte die Infektion der KMNR mit Ad-EGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) eine Steigerung der PP-Aktivität um etwa ein Drittel.

In der Serie der mit AdLacZ und AdPPI-1 infizierten KMNR zeigte sich unter Isoprenalinstimulation eine Tendenz zu erhöhter PP-Aktivität (s. Abb. 3.21). Im Gegensatz zu EGFP-überexprimierenden KMNR wiesen die β -Galactosidase überexprimierenden KMNR gegenüber den uninfizierten Kontrollen sowohl basal als auch unter Isoprenalin keine gesteigerte PP-Aktivität auf (s. Abb. 3.21). Die PP-Aktivität in ausschließlich PPI-1-überexprimierenden KMNR stieg im Vergleich zu den Kontrollen und AdLacZ infizierten KMNR unstimuliert wie auch isoprenalinstimuliert stark an (s. Abb. 3.21).

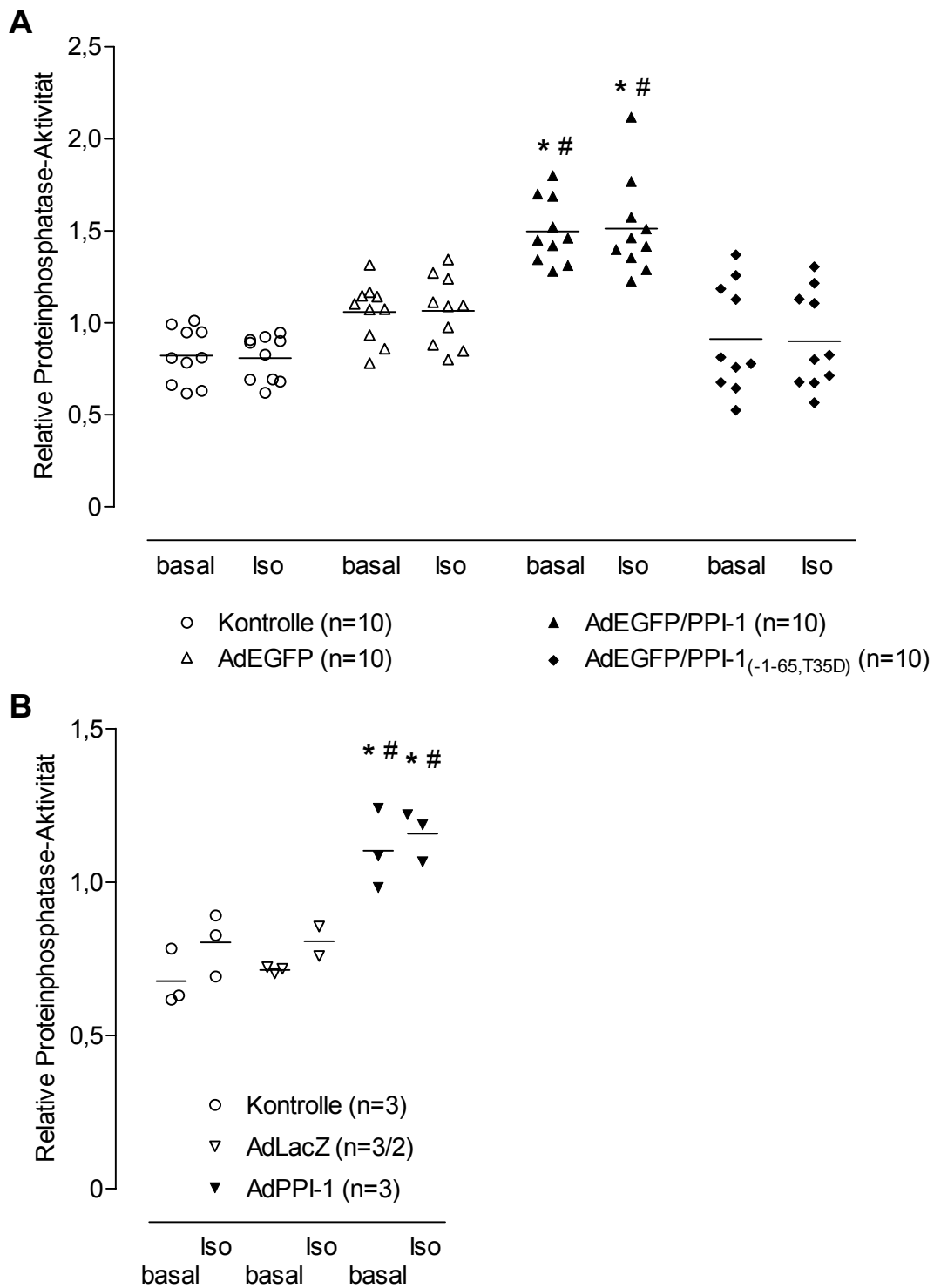


Abb. 3.21: Kumulative Aktivität der Proteinphosphatasen.

Die Hälfte der Schalen einer Bedingung wurde fünf Minuten mit 1 nM Isoprenalin (Iso) stimuliert, die andere Hälfte unstimuliert (basal) geerntet. A zeigt die Serien der EGFP-koexpressierenden KMNR, B die der AdLacZ oder AdPPI-1 infizierten KMNR. Die Ordinaten geben die relative PP-Aktivität wieder.

* $p < 0,05$ vs. Kontrollen, # $p < 0,05$ vs. AdEGFP bzw. AdLacZ.

Da Isoprenalin über die Aktivierung der β -adrenergen Signalkaskade die cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert [19; 201; 153], die PKA ihrerseits PPI-1 an Threonin³⁵ phosphoryliert und dadurch aktiviert [123; 4], wurde eine Hemmung der PP-Aktivität nach Isoprenalinstimulation erwartet. Um dies nochmals zu prüfen, wurde die Auswirkung der Zugabe von 0,1 U PKA zu Homogenaten uninfizierter KMNR untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Hemmung der PP-Aktivität durch die PKA gezeigt werden (s. Abb. 3.22).

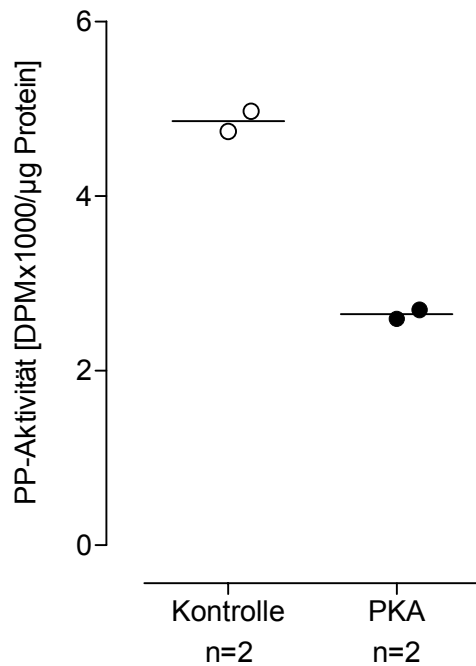


Abb. 3.22: Aktivität von PP1 und PP2A in unbehandelten KMNR mit und ohne PKA-Stimulation.

Die PP-Aktivität wurde in unstimulierten KMNR (Kontrolle) eruiert und der Aktivität in KMNR nach Zugabe von 0,13 U PKA pro μg Proteinanteil zu denselben Proben gegenübergestellt. Die Ordinate gibt die PP-Aktivität in 1/1000 radioaktiven Zerfällen pro Minute (DPM) und μg Protein der Zellhomogenate wieder.

3.2 Inhaltliche Ergebnisse

3.2.1 Effekte der PPI-1-Proteinüberexpression auf die Kontraktilität in EHTs

Um die Auswirkungen einer PPI-1-Proteinüberexpression auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten im Zellverband zu charakterisieren, wurde PPI-1 in rekonstituiertem Herzgewebe aus KMNR (*engineered heart tissue*, EHT) überexprimiert und deren Kontraktionsverhalten nach Zugabe steigender Calcium- und Isoprenalinkonzentrationen untersucht.

Initial wurden die in Tabelle 3.1 zusammengefassten Ausschlusskriterien festgelegt. EHTs, die eines dieser Kriterien nicht erfüllten, wurden aus der Wertung genommen.

Tabelle 3.1: Ausschlusskriterien für die Kontraktionsmessung der EHTs.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Siebenfache Steigerung der Vordehnung um je einen Millimeter, eine Steigerung der Kraft im Sinne eines Frank-Starling-Mechanismus, nicht erfüllt (1)• Basale Kraft zu Beginn der Calcium- (2) sowie der Isoprenalin-Konzentrationswirkungskurve (4) < 0,1 mN• Maximale Kraft bei der höchsten Calciumkonzentration < 150% oder > 600% der Ausgangslage (3)• Maximale Kraft bei der höchsten Isoprenalinkonzentration < 120% Ausgangslage (5)• Relaxationszeit ab 0,3 nM Isoprenalin nicht messbar (7) |
|---|

<p>Auf Grund dieser Kriterien wurden innerhalb der fünf Serien von 14 Kontrollen drei, von 21 AdEGFP infizierten EHTs fünf und von 26 AdEGFP/PPI-1 infizierten EHTs zehn ausgeschlossen.</p>
--

Außerdem wurden EHTs, die sich arrhythmisch verhielten und daher nicht auszuwerten waren, ausgeschlossen. Hierzu gehörten zwei EHTs, die mit AdEGFP/PPI-1 infiziert worden waren.

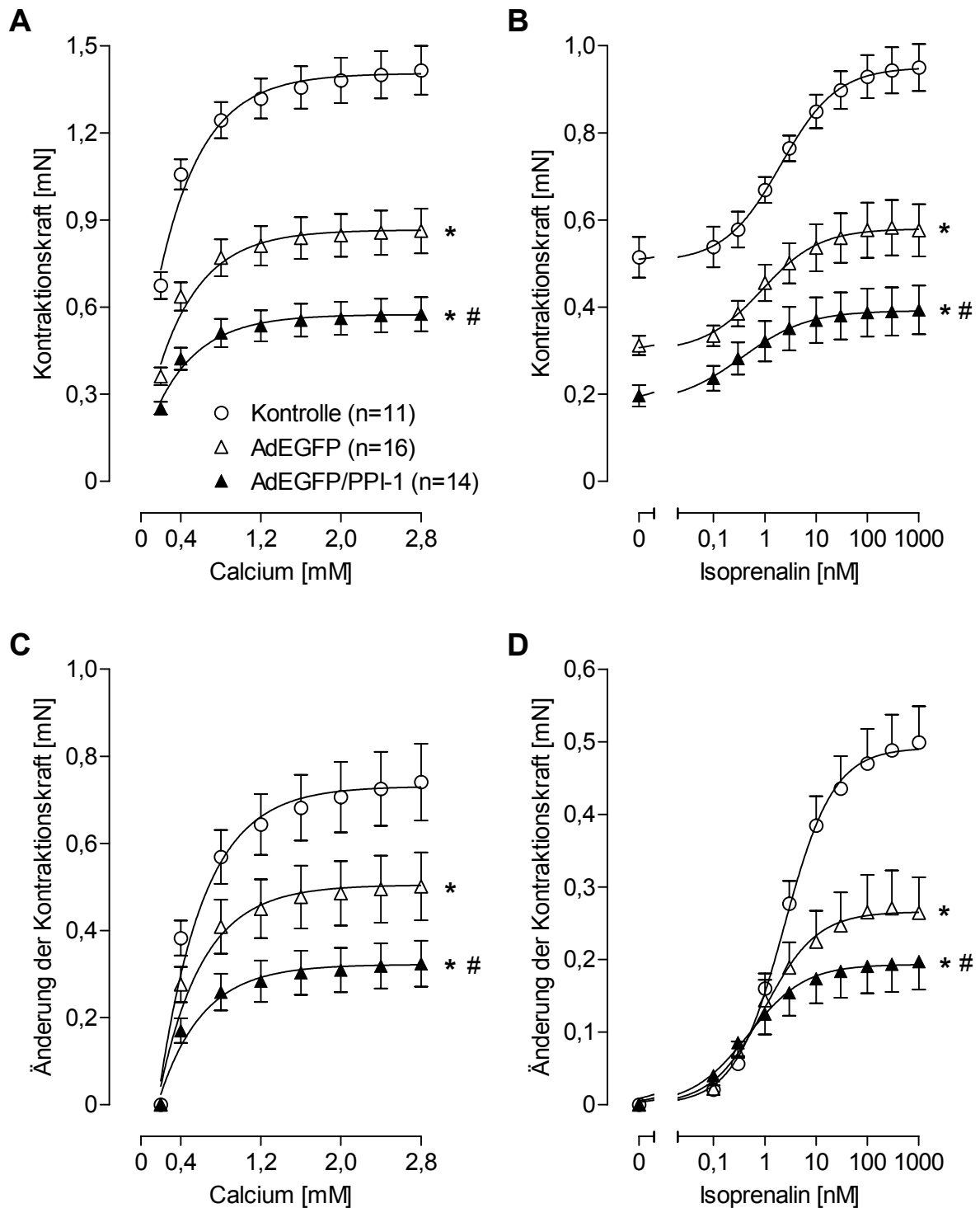


Abb. 3.23: Kontraktionskraft und Änderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von Calcium und Isoprenalin.

A und B zeigen die Kontraktionskraft, C und D die Änderung der Kontraktionskraft. Die Ordinate gibt jeweils die Kraft bzw. die Änderung der Kraft in Millinewton (mN) an. Die Abszisse gibt die Calcium- (A und C) und Isoprenalinkonzentration (B und D) an.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. AdEGFP.

Die Kontraktionsexperimente wurden wie in Kap. 2.4 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Beide Konzentrationswirkungskurven - von Calcium als auch von Isoprenalin - zeigen unter allen Bedingungen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Kontraktilität mit Erreichen eines Maximums (s. Abb. 3.23). Schon bei Vorversuchen war jedoch ein stark kontraktionsmindernder Einfluss durch die Virusinfektion *per se* oder die EGFP-Überexpression aufgefallen. Dies wurde in den hier dargestellten Serien bestätigt. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs zeigt sich schon basal eine geringere Kontraktionskraft in AdEGFP-EHTs gegenüber Kontroll-EHTs, die in AdEGFP/PPI-1-EHTs noch weiter gemindert ist (s. Abb. 3.23 A und B). Die Einzelwerte der basalen Kontraktionskraft sind zur besseren Übersicht noch einmal in Abb. 3.24 dargestellt. Die Kurvenverläufe von Kontrolle und AdEGFP, sowie von AdEGFP und AdEGFP/PPI-1 weisen deutliche Unterschiede auf (s. Abb. 3.23 D).

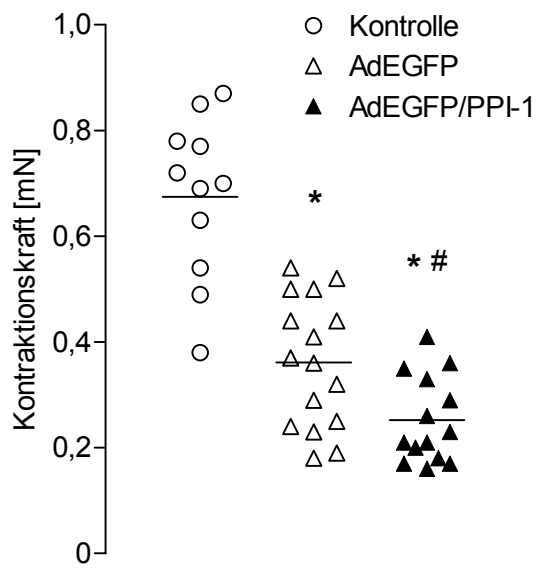


Abb. 3.24: Basale Kontraktionskraft.

Es sind die Einzelwerte der Kontraktilität der EHTs nach dem Äquilibrieren dargestellt. Die Ordinate gibt die Kontraktionskraft in Millinewton (mN) wieder.

* $p < 0,001$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. AdEGFP.

Wird die Konzentrationswirkungskurve von Isoprenalin normiert auf die Maximalkraft und jeder Wert einer Kurve in Prozent des Maximums angegeben, lässt sich die Sensitivität gegenüber der Stimulation mit Isoprenalin besonders gut dargestellt. Abb. 3.25 zeigt die entsprechenden Graphen. Es lässt sich erkennen, dass die Streuung bei PPI-1 über-exprimierenden EHTs besonders groß ist.

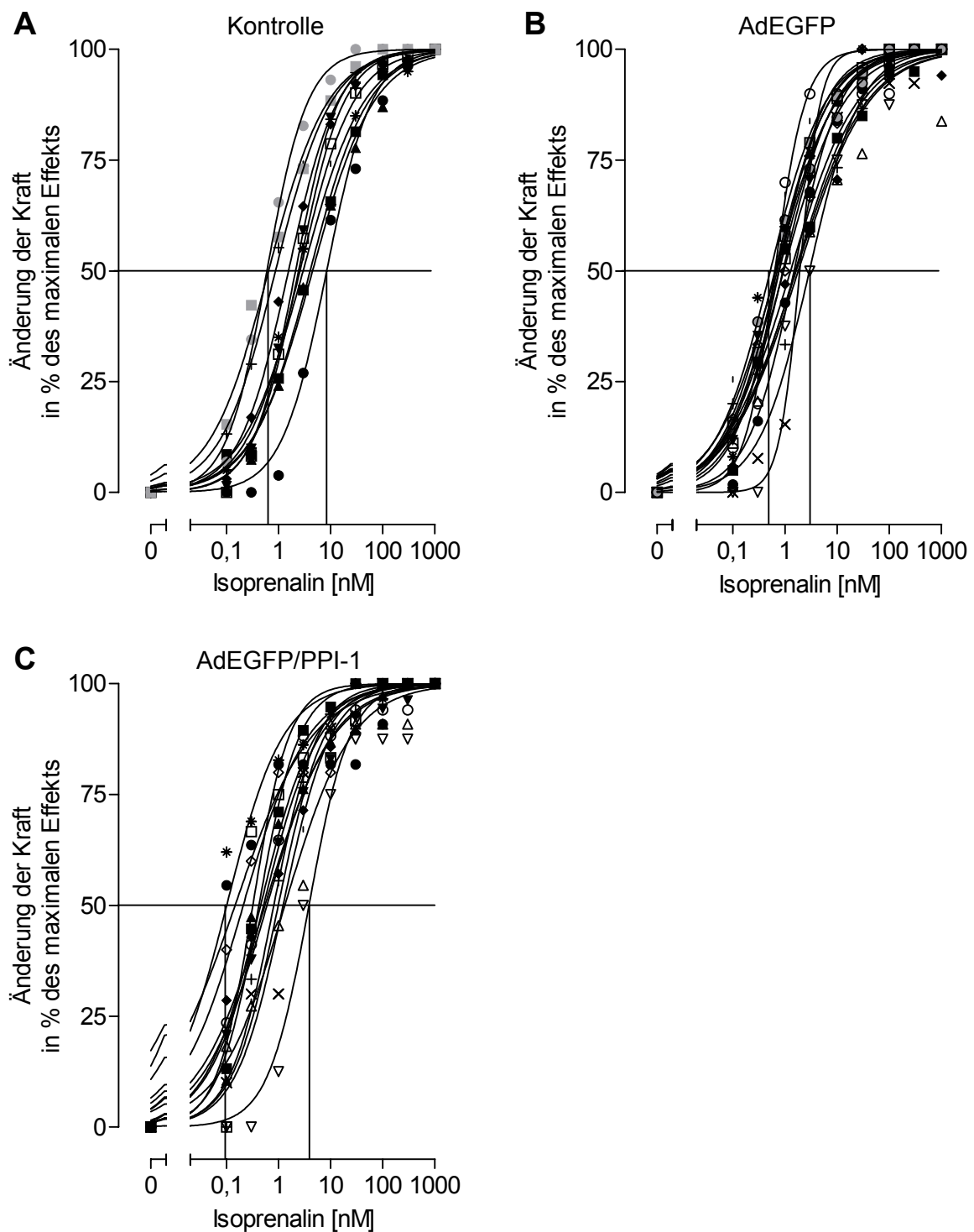


Abb. 3.25: Einzelkurven der Kontraktionskraft bezogen auf das Maximum der Kontraktionskraft

Die zum Erreichen der halbmaximalen Kraft benötigten Isoprenalinkonzentrationen sind eingegrenzt. Die Ordinate gibt die Änderung der Kraft in Prozent vom Maximum an, während die Abszisse die Isoprenalinkonzentration darstellt.

Die Zusammenfassung der Einzeldaten (s. Abb. 3.26 A) zeigte eine merkliche Linksverschiebung von AdEGFP-EHTs gegenüber Kontroll-EHTs und eine noch stärkere Links-

verschiebung von AdEGFP/PPI-1-EHTs gegenüber AdEGFP-EHTs. Aus den einzelnen Kurven (s. Abb. 3.25) wurden die EC_{50} berechnet und in Abb. 3.26 B dargestellt.

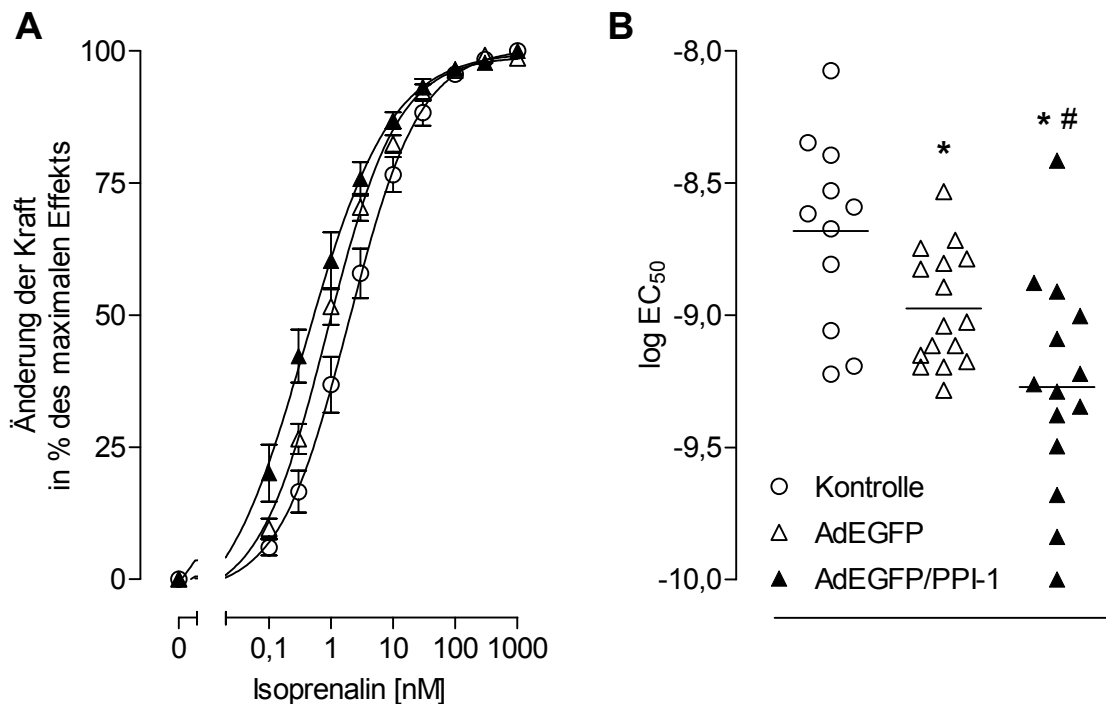


Abb. 3.26: Änderung der Kraft bezogen auf die Maximalkraft und die EC_{50} der EHTs.

In A wurden die Mittelwerte aus Abb. 3.25 aufgetragen, die Ordinate gibt hier die Änderung der Kraft in Prozent vom Maximum an, während die Abszisse die Isoprenalin-konzentration in Nanomol (nM) ausdrückt. B zeigt die dazugehörigen logarhythmisierten Werte der EC_{50} , die an der Ordinate aufgetragen sind.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. AdEGFP.

Da aus den Beobachtungen der KMNR in der Immunzytologie das Problem der inhomogenen Infektion bereits bekannt war (vgl. Kap. 3.1.2.2, Abb. 3.16), könnte die starke Varianz der EC_{50} in AdEGFP/PPI-1-EHTs auch darin begründet sein. Aus diesem Grund wurde die EC_{50} mit der optischen Einschätzung der Infektionsstärke durch die EGFP-Fluoreszenz korreliert (s. Abb. 3.27). Es stellte sich heraus, dass gerade die EHTs, welche am „stärksten“ infiziert schienen die größte Streuung der EC_{50} verursachten.

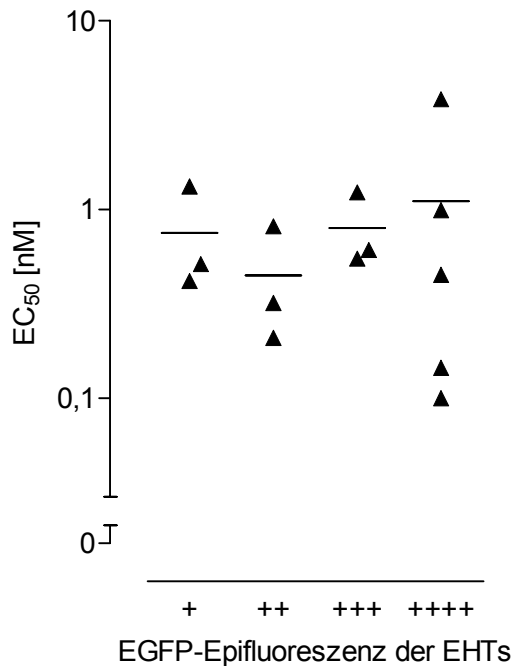


Abb. 3.27: Korrelation der EC_{50} von AdEGFP/PPI-1-EHTs mit der EGFP-Epifluoreszenz.

Die Ordinate gibt die EC_{50} von Isoprenalin in Nanomol (nM) wieder, die Abszisse ein relatives Maß für die grüne Fluoreszenz.

Die Auswertung der Zeit zur 90%igen Relaxation erbrachte keine aufschlussreichen Ergebnisse (s. Abb. 3.28). Die Fehlerabweichung erwies sich als beträchtlich, die Unterschiede zwischen den Gruppen hingegen als sehr gering.

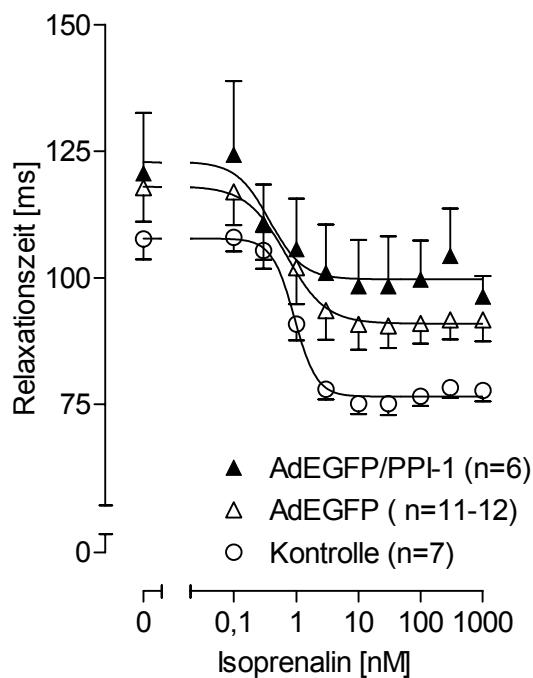


Abb. 3.28: Relaxationszeiten.

Für die Bestimmung der Relaxationszeit wurde die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zum Erreichen von 90% der Relaxation gemessen. Die Ordinate gibt die Zeit in Millisekunden (ms) wieder, die Abszisse die Isoprenalin-Konzentration in Nanomol (nM).

3.2.2 Effekte der PPI-1 Überexpression auf den Phosphorylierungszustand von Phosphoproteinen in KMNR Monolayer

3.2.2.1 Phospholamban

Phospholamban (PLB) wird PKA-abhängig an Serin¹⁶ und durch die calcium/calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK II) an Threonin¹⁷ phosphoryliert [215; 159]. Beide Aminosäurereste werden von PP1 dephosphoryliert [145; 35].

Zunächst wurde das Ausmaß der PLB-Serin¹⁶-Phosphorylierung kultivierter KMNR unter steigenden Isoprenalin-Konzentrationen (0,01-100 nM) untersucht. Im Immunoblot wurden die Proben auf ihren Gehalt an Calsequestrin, PPI-1 und Phospho-Serin¹⁶-PLB hin untersucht. Der in allen Untersuchungen verwendete polyklonale Antikörper gegen Phospho-Serin¹⁶-PLB (PS16) erkennt an Serin¹⁶ phosphoryliertes PLB [74; 170], ist jedoch nicht in der Lage, dual – an Serin¹⁶ und Threonin¹⁷ – phosphoryliertes PLB zu dedektieren [60; 162]. Calsequestrin (CSQ) wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Ein exemplarisch gezeigter Western-Blot (s. Abb. 3.29 A) stellt die gleichmäßige Beladung und die starke Überexpression von PPI-1 in AdEGFP/PPI-1 infizierten KMNR dar. Die Phosphorylierung von PLB an Serin¹⁶ erwies sich als relativ schwach unter basalen Bedingungen, stieg jedoch schon unter sehr niedrigen Konzentrationen von Isoprenalin (ab 0,01 nM) an. Das Maximum, welches bei AdEGFP infizierten KMNR bei 1 nM Isoprenalin erreicht wurde, erreichten die AdEGFP/PPI-1 infizierten schon bei 0,1 nM. Die uninfizierten Kontrollen zeigten ihr Maximum ebenfalls bei 1 nM Isoprenalin. Das Maximum der Phosphorylierung schien jedoch bei AdEGFP/PPI-1 etwas höher zu sein als bei uninfizierten Kontrollen und AdEGFP.

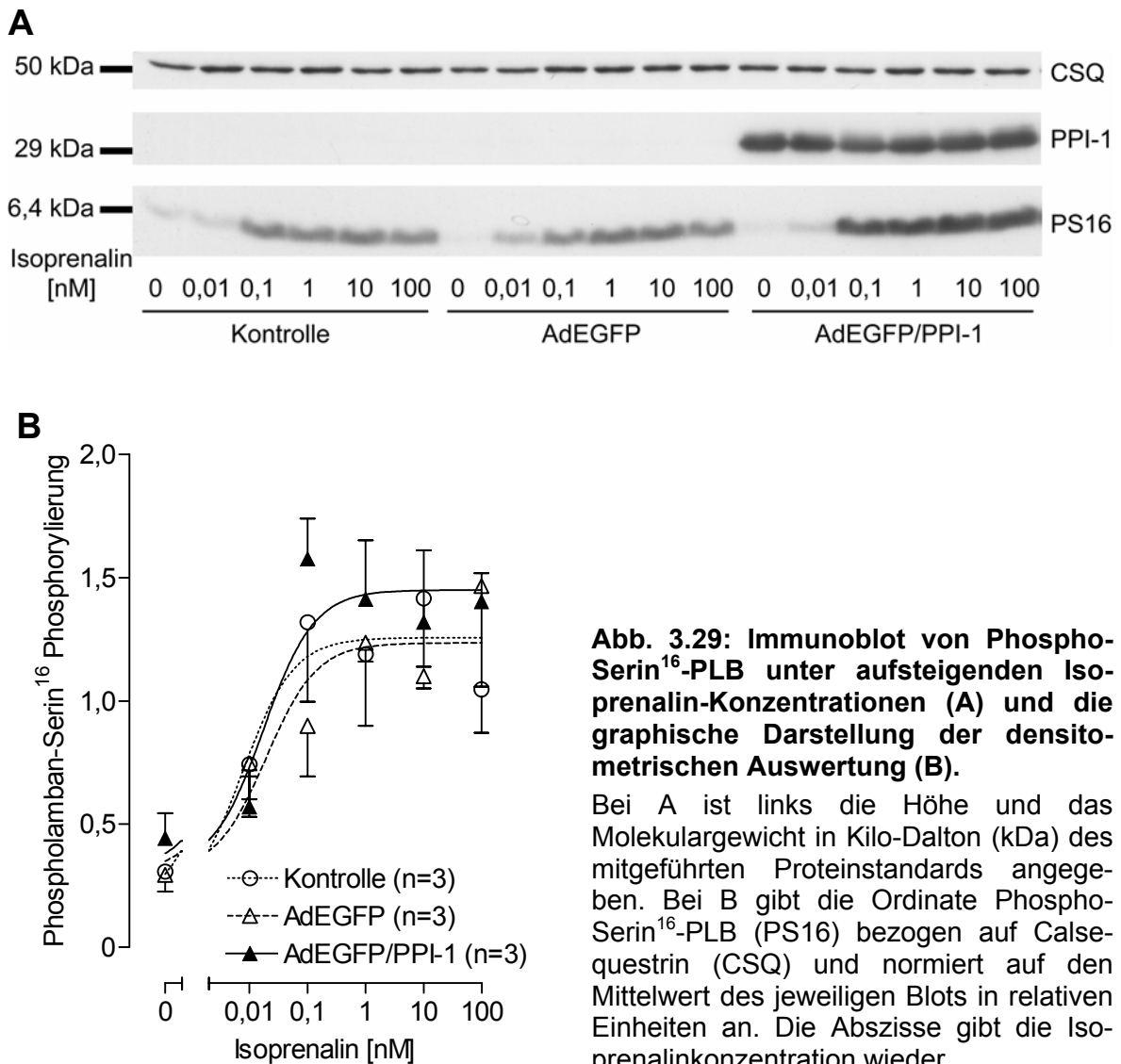


Abb. 3.29: Immunoblot von Phospho-Serin¹⁶-PLB unter aufsteigenden Isoprenalin-Konzentrationen (A) und die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung (B).

Bei A ist links die Höhe und das Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa) des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Bei B gibt die Ordinate Phospho-Serin¹⁶-PLB (PS16) bezogen auf Calsequestrin (CSQ) und normiert auf den Mittelwert des jeweiligen Blots in relativen Einheiten an. Die Abszisse gibt die Isoprenalinkonzentration wieder.

Die densitometrische Auswertung (s. Abb. 3.29 B) spiegelte den Anstieg der Phosphorylierung an PLB-Serin¹⁶ wieder, konnte aber auf Grund großer Streuung trotz Bezug jeder Probe auf die jeweilige Calsequestrin-Bande und Normierung von Calsequestrin, wie auch von Phospho-Serin¹⁶-PLB, auf den densitometrischen Mittelwert dieses Proteins des jeweiligen Blots, keine eindeutigen Ergebnisse zeigen.

Daraufhin wurde in mehreren Serien die Phosphorylierung von PLB-Serin¹⁶ in KMNR ohne vorherige Isoprenalinstimulation derjenigen nach Stimulation gegenübergestellt. Aus drei verschiedenen Zellpräparationen stammende KMNR wurden nicht oder mit AdEGFP oder AdEGFP-PPI-1 oder AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) infiziert. Jeweils die Hälfte der Zellschalen einer Infektionsbedingung wurde mit 1 nM Isoprenalin stimuliert.

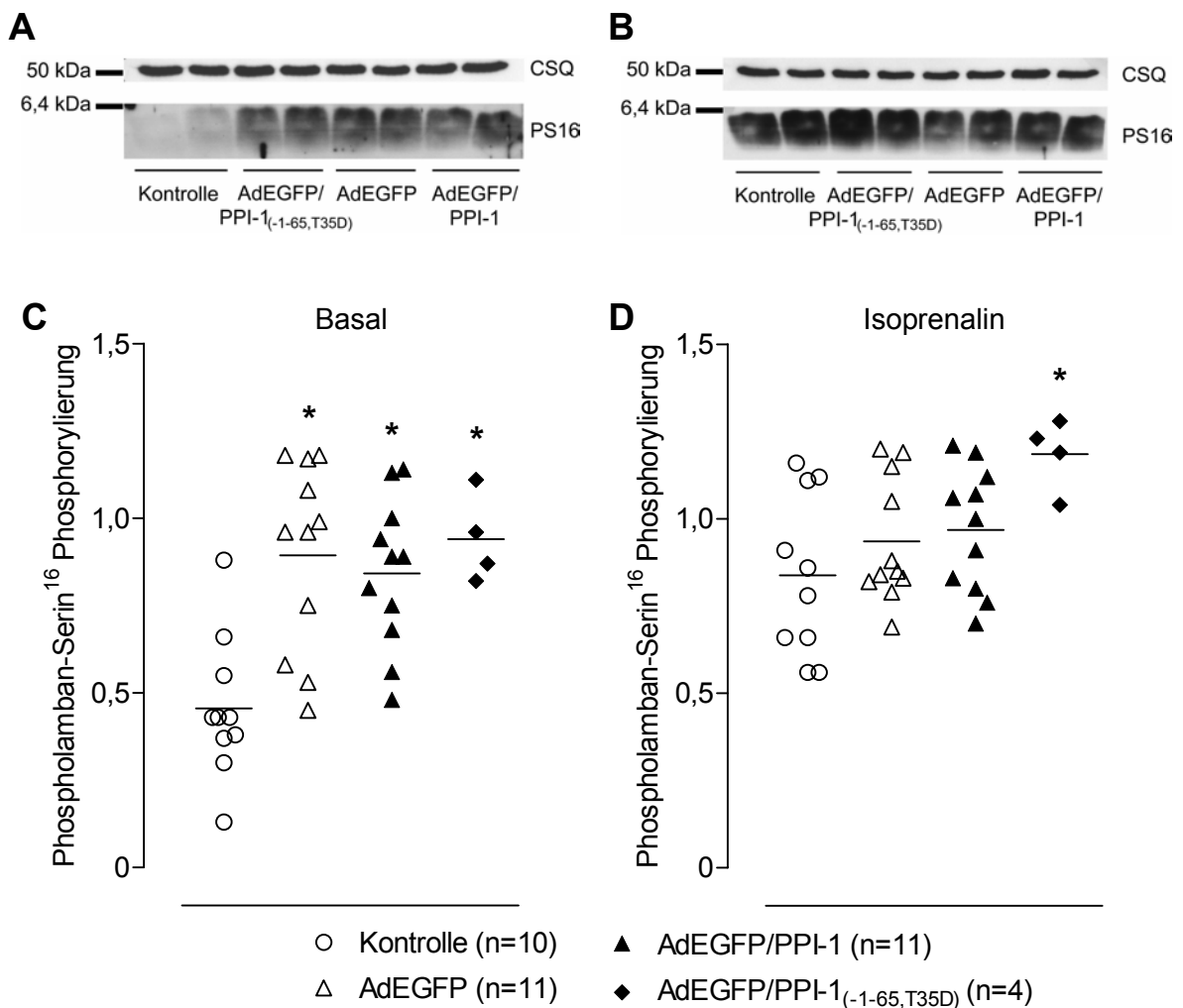


Abb. 3.30: PLB-Serin¹⁶ Phosphorylierung ohne (A, C) und nach (B, D) Stimulation mit 1 nM Isoprenalin, sowie die densitometrische Auswertung.

Bei A und B sind links die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Ordinate in C und D gibt Phospho-Serin¹⁶-PLB (PS16) bezogen auf Calsequestrin (CSQ) und normiert auf die dichteste Bande des jeweiligen Proteins und Blots in relativen Einheiten an.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

In der Gruppe der KMNR, die mit EGFP-koexprimierenden Adenoviren behandelt wurden, zeigte sich basal eine stark erhöhte Phosphorylierung an PLB-Serin¹⁶ im Vergleich zu den uninfierten Kontrollen ($p < 0,05$; s. Abb. 3.30 A und C), während innerhalb der adenoviral infizierten KMNR keine Unterschiede zu erkennen waren.

Die Stimulation mit 1 nM Isoprenalin führte zum weitgehenden Ausgleich dieser Differenz zwischen AdEGFP, sowie AdEGFP/PPI-1 und den Kontrollen und zeigte eine Tendenz hin zu einer erhöhten PLB-Serin¹⁶-Phosphorylierung bei PPI-1-überexprimierenden EHTs. Die AdEGFP/PPI-1(-1-65, T35D) infizierten KMNR hingegen wiesen im Vergleich zu denen,

die AdEGFP, AdEGFP/PPI-1 oder kein Virus erhielten, eine erhöhte Phosphorylierung von Serin¹⁶ an PLB auf ($p < 0,05$; s. Abb. 3.30 B und D).

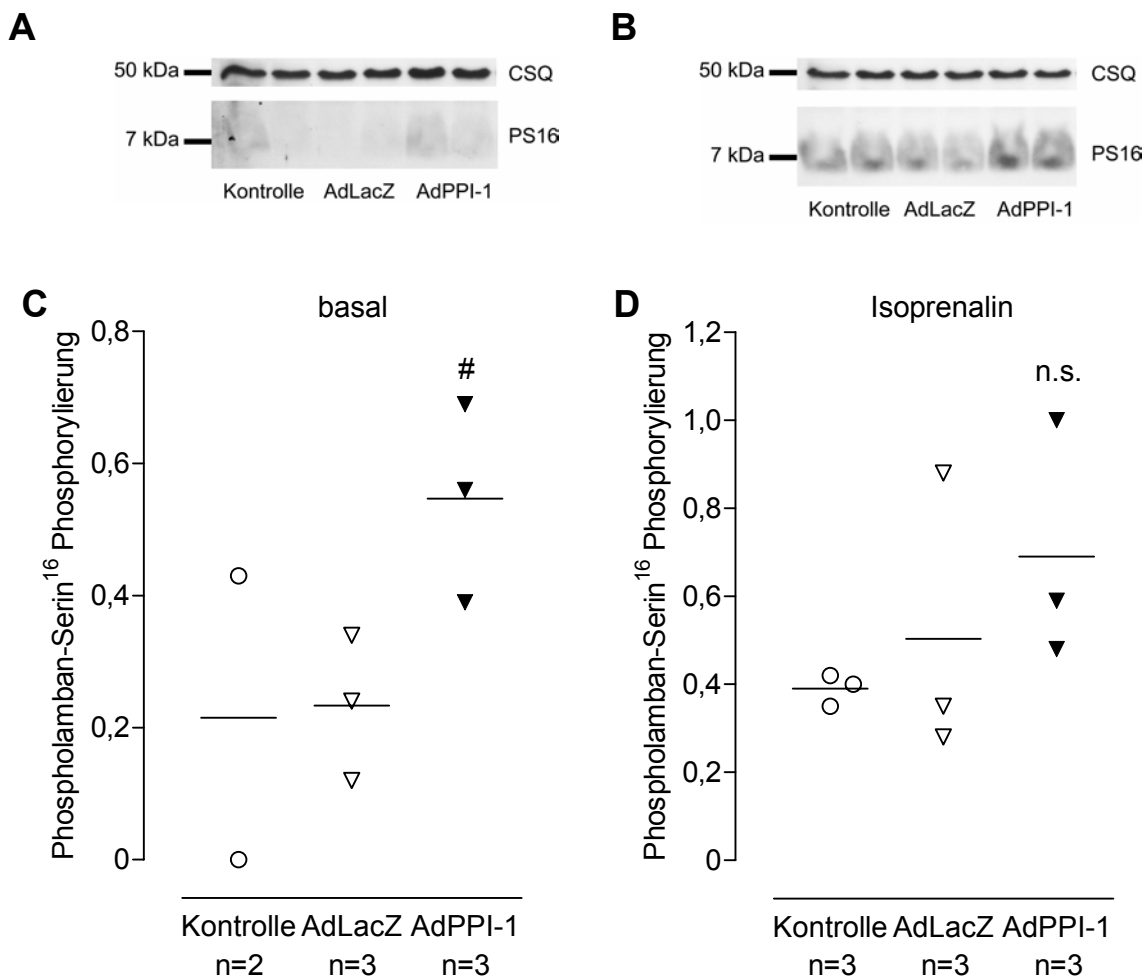


Abb. 3.31: PLB-Serin¹⁶ Phosphorylierung basal (A, C), unter 1 nM Isoprenalin (B, D) und die densitometrische Auswertung.

In A und B sind links die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Ordinate in C und D gibt den Gehalt an Phospho-Serin¹⁶-PLB (PS16) bezogen auf Calsequestrin (CSQ) in relativen Einheiten an.

$p < 0,05$ vs. AdLacZ; n.s., nicht signifikant.

Bei den KMNR, die mit AdPPI-1 infiziert wurden, zeigte sich ohne Stimulation mit Isoprenalin eine erhöhte Phosphorylierung an PLB-Serin¹⁶ ($p = 0,0437$ vs. AdLacZ; s. Abb. 3.31 A und C). Zwischen AdLacZ und uninfizierten Kontrollen konnte hier im Gegensatz zu den EGFP exprimierenden KMNR kein Unterschied beobachtet werden. Unter Isoprenalinstimulation zeigten alle eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung, an PPI-1 überexprimierenden KMNR zeigte sich erneut eine Tendenz zu erhöhter PLB-Serin¹⁶-Phosphorylierung, die jedoch nicht signifikant war (s. Abb. 3.31 B und D).

Desweiteren wurde die Phosphorylierung an PLB-Threonin¹⁷ untersucht. Der hierfür verwendete Antikörper (PT17) reagiert mit Phospho-Threonin¹⁷-PLB und dual phosphoryliertem PLB, weist allerdings ebenfalls eine Kreuzreaktivität mit, an Serin¹⁶ monophosphoryliertem, PLB auf [74; 60; 162].

Die hierzu untersuchten Proben stammen aus zwei unterschiedlichen Zellpräparationen und wurden mit AdEGFP oder AdEGFP/PPI-1 oder nicht infiziert. Die Hälfte der Proben je Bedingung wurde unstimuliert, die andere Hälfte nach Stimulation mit 1 nM Isoprenalin geerntet. Bei KMNR, die nicht mit Isoprenalin stimuliert wurden, konnte keine Phosphorylierung von PLB an Threonin¹⁷ nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Bei isoprenalin-stimulierten, uninfizierten Kontrollen konnte eine deutliche Bande beobachtet werden, die bei AdEGFP etwas schwächer und bei AdEGFP/PPI-1 kaum zu sehen war (s. Abb. 3.32 A).

KMNR aus einer Zellpräparation wurden mit AdLacZ oder AdPPI-1 infiziert. Die Hälfte der KMNR wurde mit Isoprenalin stimuliert. Wiederum konnte die Phosphorylierung von Threonin¹⁷-PLB der unstimulierten Kardiomyozyten nicht detektiert werden. Die PLB-Threonin¹⁷-Phosphorylierung in PPI-1-überexprimierenden KMNR ließ sich unter Isoprenalin kaum steigern, während die uninfizierten Kontrollen und β -Galactosidase produzierenden Kardiomyozyten eine stark erhöhte Phosphorylierung an PLB-Threonin¹⁷ zeigten (s. Abb. 3.32 B).

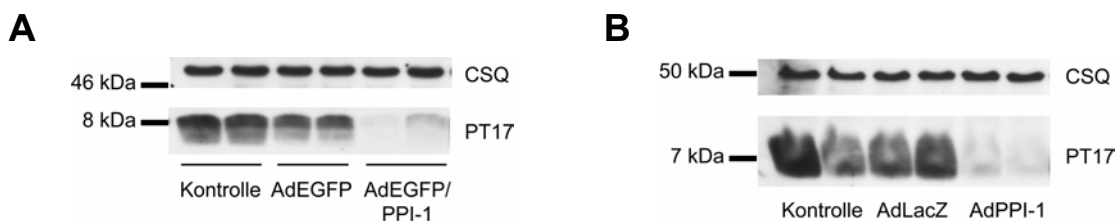


Abb. 3.32: PLB-Threonin¹⁷ Phosphorylierung nach 1 nM Isoprenalin.

Neben den uninfizierten Kontrollen wurden die KMNR mit AdEGFP oder AdEGFP/PPI-1 (A), sowie mit AdLacZ oder AdPPI-1 (B) infiziert. Links sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

3.2.2.2 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören zu den Schlüsselenzymen der Zellfunktion [202]. Sie werden über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert und neuere Untersuchungen zeigen, dass p38, das zur Familie der MAPK gehört, Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten nimmt [151].

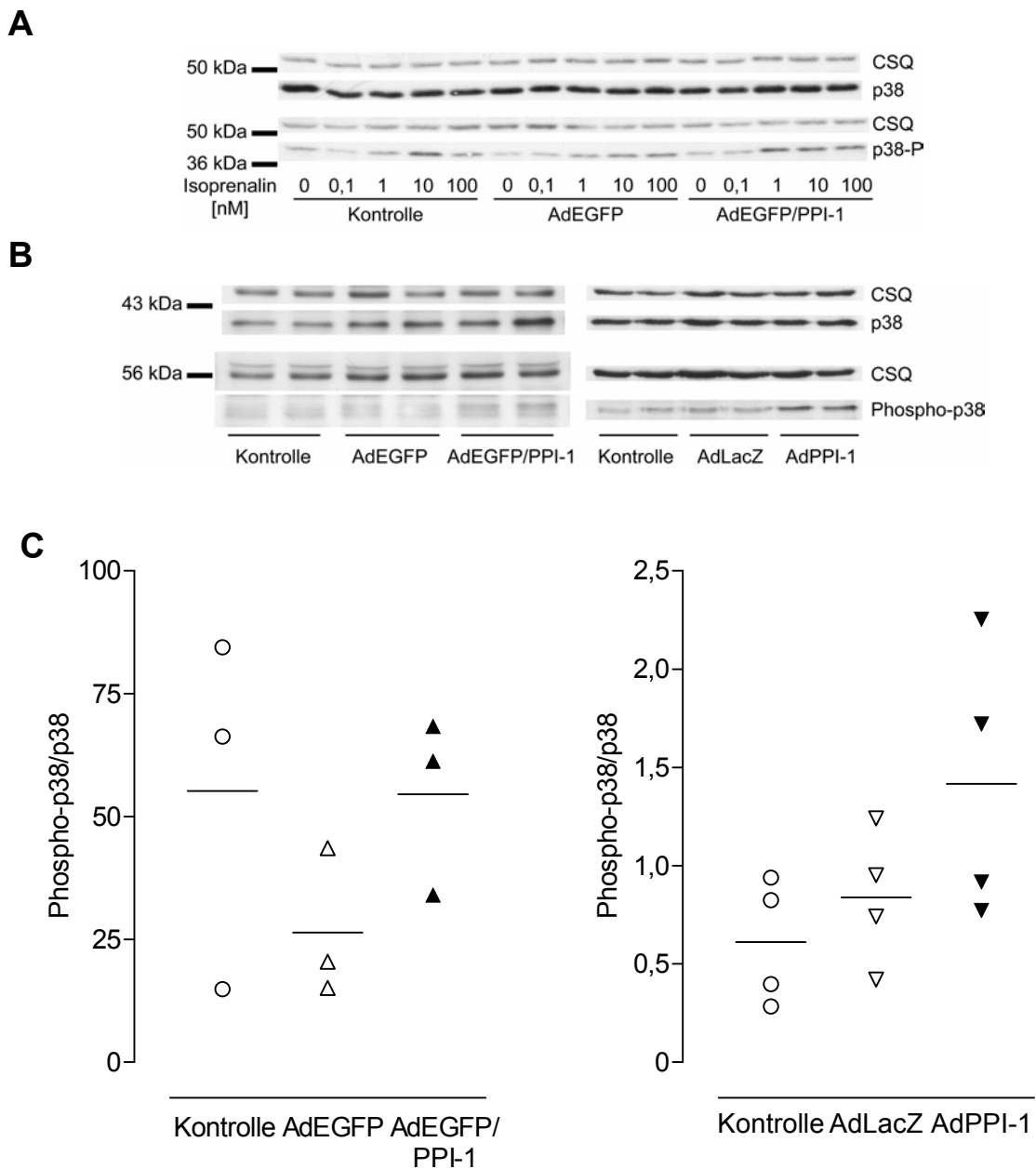


Abb. 3.33: Phosphorylierung von p38 unter steigenden Isoprenalinkonzentrationen (A) und nach 1 nM Isoprenalin (B) im Western Blot und die densitometrische Auswertung von B (C).

In A und B ist links die Höhe und das Molekulargewicht des Proteinstandards angegeben. Die Ordinate in C gibt den Gehalt an Phospho-p38/p38 bezogen auf Calsequestrin an.

Die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinase (Erk) wurde im Immunoblot mit einem Antikörper ermittelt, der nur an Threonin¹⁸³ und an Tyrosin¹⁸⁵ phosphoryliertes Erk2 der Ratte detektiert. Mit einem weiteren Antikörper wurde die Konzentration an Gesamtprotein evaluiert und der Anteil der Phosphorylierung ermittelt. Die p38 Phosphorylierung

wurde mit einem Antikörper untersucht, der nur dual - an Threonin¹⁸⁰ und Tyrosin¹⁸² - phosphoryliertes p38 erkennt.

Isoprenalinstimulierte KMNR aus zwei unterschiedlichen Zellpräparationen gingen in die Untersuchung der Phosphorylierung von p38 ein. Sie wurden mit AdEGFP, AdEGFP/PPI-1 oder nicht infiziert. Während die Konzentration des Proteins nicht verändert war, zeigte sich in PPI-1 überexprimierenden KMNR eine etwas stärkere Phosphorylierung als bei EGFP oder β -Galactosidase überexprimierenden Kardiomyozyten (s. Abb. 3.33). Die Phosphorylierung ließ sich isoprenalinabhängig steigern (s. Abb. 3.33A).

Die densitometrische Auswertung (s. Abb. 3.33) zeigt, dass sowohl in der „EGFP-Serie“, noch mehr jedoch in der „LacZ-Serie“ die Tendenz einer erhöhten Phosphorylierung in PPI-1 überexprimierenden KMNR zu erkennen ist.

Die Untersuchung der Erk2-Phosphorylierung erfolgte in denselben Proben. Im Gegensatz zur Phosphorylierung an p38 konnte für die an Erk2 im Vergleich zu Kontrollinfizierten keine Veränderung der Phosphorylierung in PPI-1 überexprimierenden KMNR beobachtet werden (nicht gezeigt).

3.2.2.3 GTP-bindende Proteine

Da die Linksverschiebung der kontraktilen Antwort auf Isoprenalin in den AdEGFP infizierten EHTs auch auf eine veränderte Regulation der GTP-bindenden (G-) Proteine, vor allem auf eine erhöhte Konzentration des stimulierenden G-Proteins (G_s), durch die Virusinfektion *per se*, zurückzuführen sein könnte [180], wurde der Gehalt an stimulierendem und inhibierendem G-Protein in KMNR mittels Western Blot untersucht. Zur Evaluation des inhibierenden G-Proteins (G_i) wurde ein Antikörper verwendet, der den 40 kDa schweren Subtyp der α -Untereinheit von G_i ($G\alpha_{i-2}$) erkennt. Für G_s wurde ein Antikörper gewählt, der gegen die α -Untereinheiten von G_s ($G\alpha_s$) mit 45 und 52 kDa gerichtet ist (s. Tabelle 2.7).

Es konnte weder für G_{i-2} noch für G_s ein Unterschied in der Konzentration zwischen uninfizierten und AdEGFP infizierten KMNR dargestellt werden (s. Abb. 3.34).

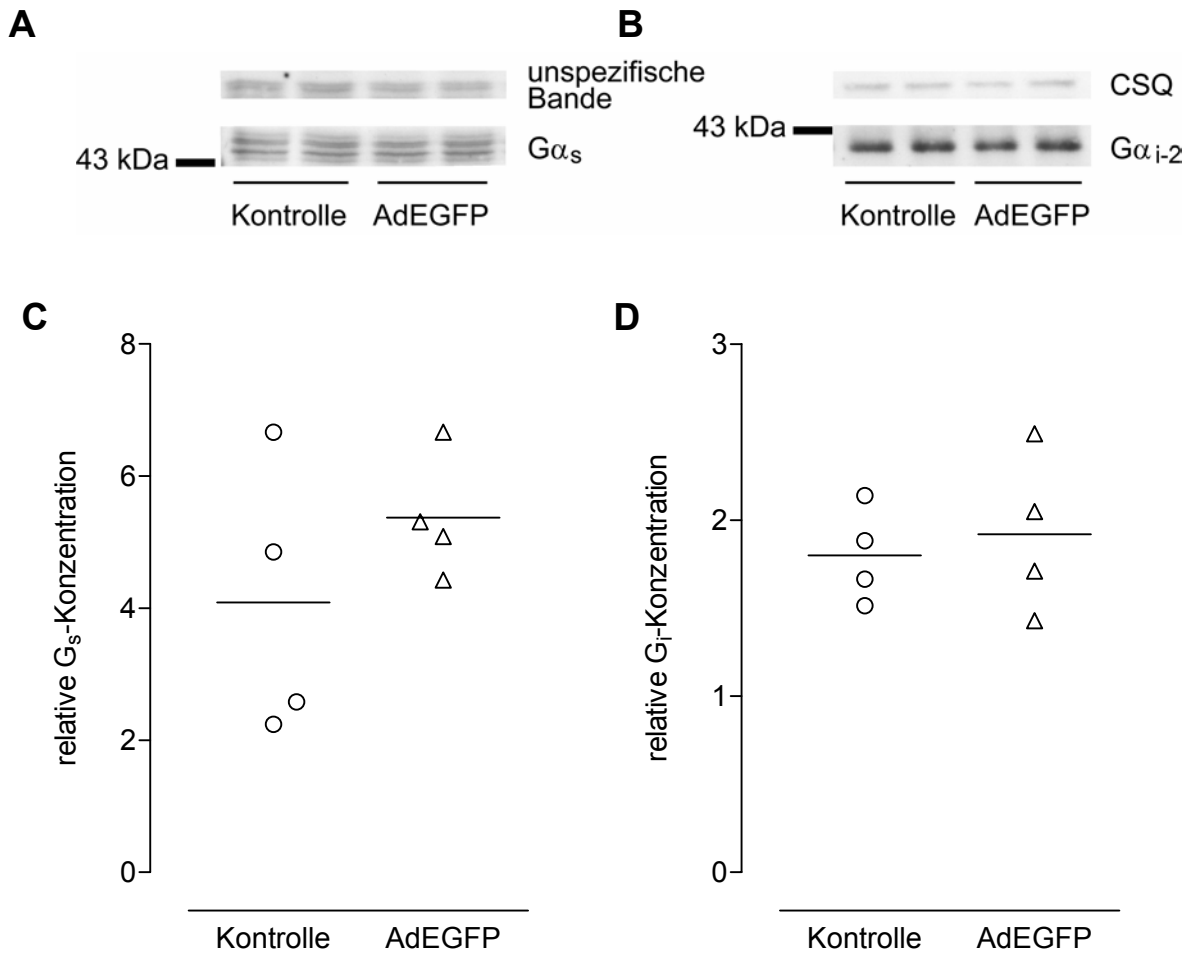


Abb. 3.34: Konzentration von G_s (A, C) und G_i (B, D) in KMNR.

Es wurde der Gehalt an stimulierendem G-Protein (G_s) (A, C) und von inhibierendem G-Protein (G_i) (B, D) ermittelt. Jeweils links neben dem Immunoblot ist die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Ordinate der Graphik gibt den Gehalt von $G\alpha_s$ oder $G\alpha_{i-2}$ bezogen auf eine unspezifische Bande (A) oder auf Calsequestrin (B) in relativen Einheiten an.

3.2.3 Effekte auf die cAMP Akkumulation

Da cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) eine zentrale Rolle in der β -adrenergen Signalkaskade spielt, sollte auch eine mögliche Beeinflussung dieses sekundären Botenstoffes durch die PPI-1 Überexpression untersucht werden. Der cAMP Gehalt wurde wie in 2.5.5 beschrieben basal, unter Stimulation mit 10 μ M Isoprenalin und 15 μ M Forskolin, welches direkt die Adenylylcyclase aktiviert, bestimmt.

Aus zwei Zellpräparationen stammende KMNR wurden mit AdEGFP und AdEGFP/PPI-1 infiziert. Der cAMP Gehalt wurde in zwei Versuchsreihen ermittelt. In beiden Serien stieg die cAMP Akkumulation gegenüber den basalen Werten um mehr als das 100-fache unter Isoprenalin- und Forskolinstimulation an. Hierbei konnte in der Gruppe der isoprenalin- und Forskolinstimulierten KMNR eine deutlich verminderte cAMP Akkumulation in PPI-1 überexprimierenden KMNR im Vergleich zu den AdEGFP infizierten KMNR ($p < 0,05$) beobachtet werden (s. Abb. 3.35).

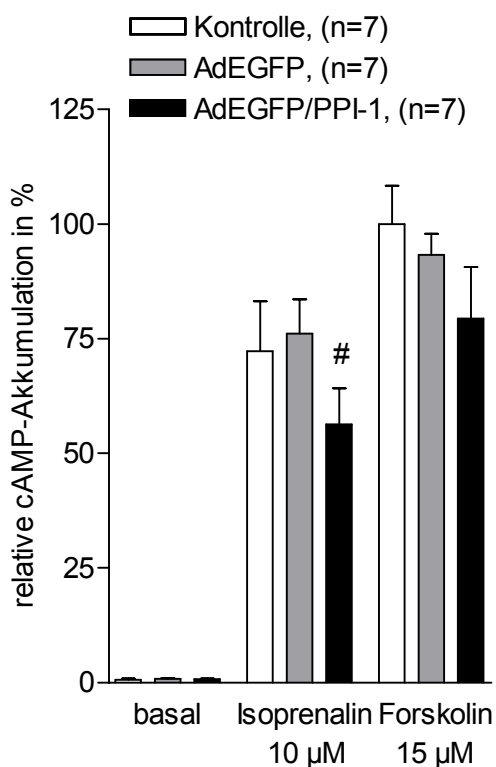


Abb. 3.35: cAMP Akkumulation in KMNR.

Die Ordinate gibt die relative cAMP Akkumulation pro 10^6 KMNR, normiert auf den Mittelwert der forskolinstimulierten KMNR wieder.

$p < 0,05$ vs. AdEGFP.

3.2.4 Effekte auf die Zellgröße

Um Hinweise auf den Zustand der Kardiomyozyten im Sinne von Hypertrophie oder Apoptose zu erhalten, wurde die Zytomorphologie der KMNR untersucht. Nach 48 h Infektion mit einer MOI von zwei wurden die KMNR mit einem Antikörper gegen α -sarkomerisches Actinin inkubiert und dessen Lokalisation über einen Cy3-gekoppelten (rot fluoreszier-

enden) Antikörper im konfokalen Lasermikroskop sichtbar gemacht (s. Kap. 2.6). So konnten alle Zellen, die sich auf dem Deckgläschen befanden, gesichtet und zwischen Fibrozyten und Kardiomyozyten differenziert werden (s. Abb. 3.36).

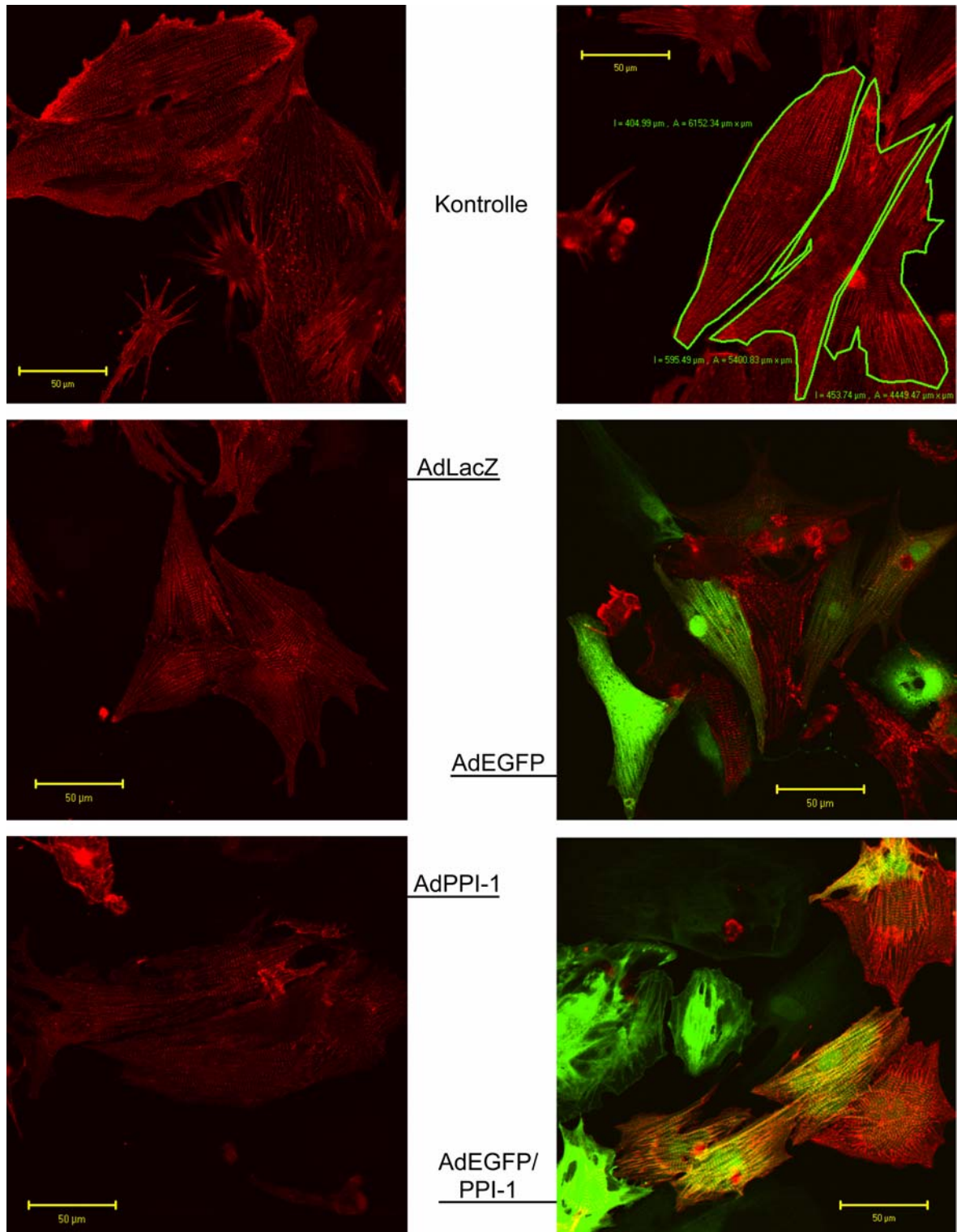


Abb. 3.36: Morphologie der KMNr nach 48 h, adenoviraler Infektion.

Zur Bestimmung des Zellquerschnitts wurden die KMNr umrandet und die Flächen berechnet (oben rechts). Der eingetragene Maßstab entspricht 50 µm.

Im LSM wurde der Umfang einzelner Kardiomyozyten gemessen und die Fläche berechnet (s. Abb. 3.36). Es wurde darauf geachtet, dass die gemessenen Kardiomyozyten möglichst viel Kontakt zu Nachbarzellen haben, da dieser zu einer besseren Ausdehnung der Zellen führt. Dabei erbrachte die Flächenberechnung der uninfizierten Kontrollen eine durchschnittliche Fläche von $4528 \pm 175 \mu\text{m}^2$, die in etwa auch der, AdLacZ infizierter, KMNR entsprach. AdPPI-1 liegt mit $4884 \pm 313 \mu\text{m}^2$ etwas darüber, während AdEGFP mit $3804 \pm 310 \mu\text{m}^2$, sowie AdEGFP/PPI-1 mit $3627 \pm 296 \mu\text{m}^2$ deutlich, wenn auch nicht signifikant, unter diesem Wert liegen (s. Abb. 3.37).

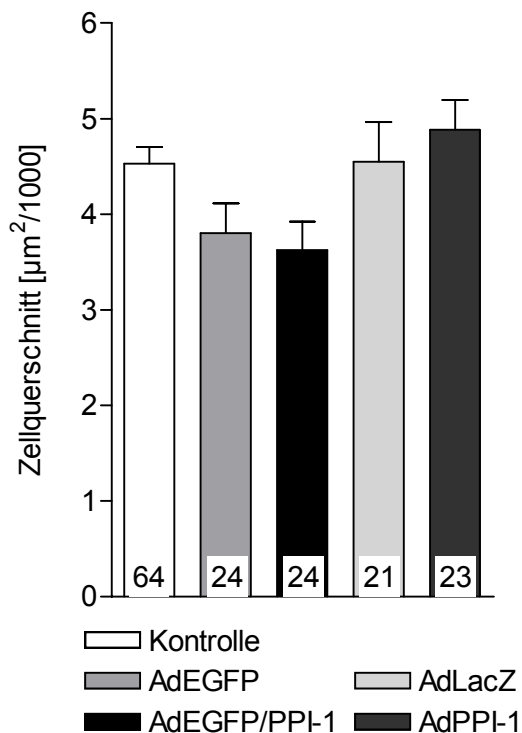


Abb. 3.37: Zellfläche der KMNR.

Die Ordinate gibt die Zellfläche als 1/1000 Quadratmikrometer wieder, die Zahlen in den Balken entsprechen der Anzahl untersuchter KMNR.

3.2.5 Effekte auf die Protein- und RNA-Konzentration

Die Proteinkonzentration in den KMNR wurde nach Bradford bestimmt, auf den Mittelwert der Kontrollen der jeweiligen Serie normiert und graphisch dargestellt. Hier zeigten sich in etwa äquivalent die Proteinkonzentrationen in AdEGFP, AdEGFP/PPI-1 und AdEGFP/PPI-1_(-1-65, T35D) infizierten KMNR vs. uninfizierten Kontrollen, während AdLacZ (+46±14%) und AdPPI-1 (+32±12%) infizierte KMNR gegenüber den Kontrollen deutlich höhere Konzentrationen aufwiesen (s. Abb. 3.38).

Im Weiteren wurde aus infizierten KMNR einer Zellpräparation die RNA extrahiert und deren Konzentration bestimmt. Dabei zeigten die EGFP überexprimierenden KMNR eine erhebliche Mehrproduktion an RNA als die uninfizierten Kontrollen oder mit AdLacZ und

AdPPI-1 infizierte KMNR (s. Abb. 3.38). Die Kontrollen pendelten sich mit der größten Streuung bei $0,52 \pm 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ein. Auf diesem Niveau hielten sich auch AdLacZ mit $0,53 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und AdPPI-1 mit $0,57 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, weit hinter AdEGFP mit $0,73 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und AdEGFP/PPI-1 mit $0,66 \pm 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

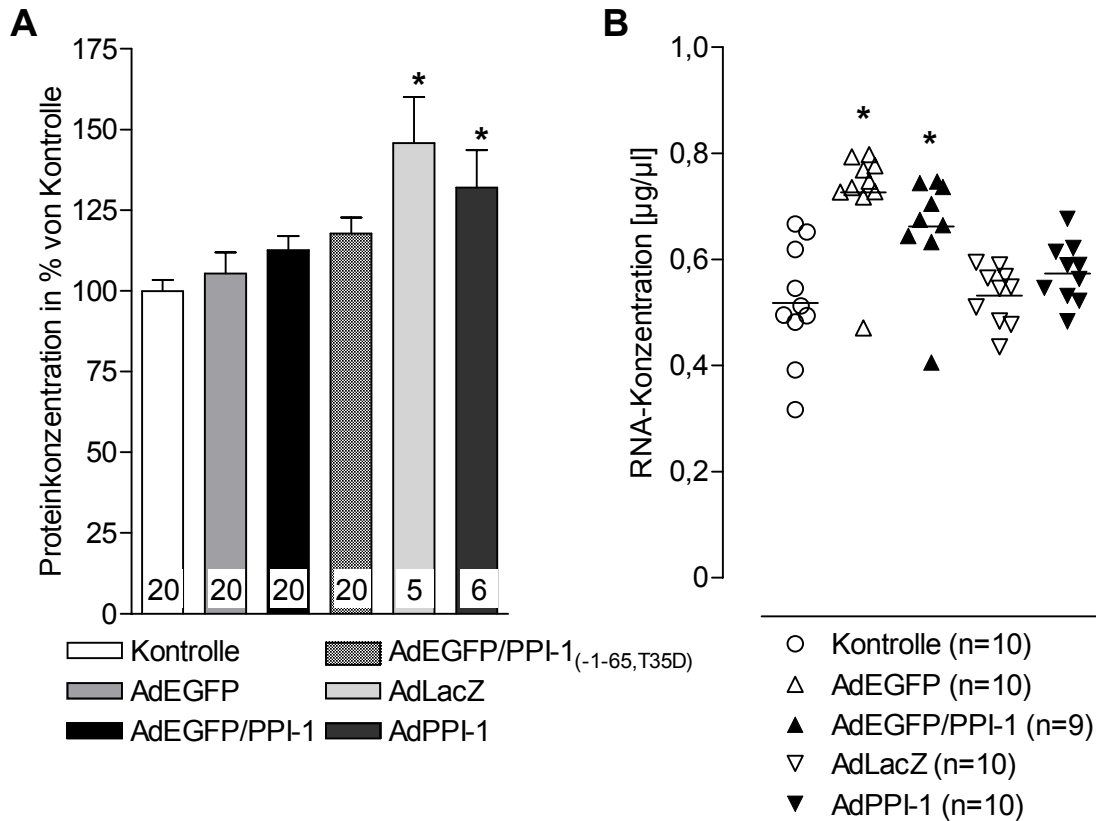


Abb. 3.38: Protein- (A) und RNA- (B) Konzentration kultivierter KMNR.

In A gibt die Ordinate die Proteinkonzentration in % der Kontrollen an. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben. Die Ordinate in B gibt die RNA-Konzentration wieder.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Um die Relation zwischen Protein- bzw. RNA-Konzentration und Zellfläche zu veranschaulichen wurden die Mittelwerte aus Abb. 3.38 mit den Mittelwerten der Zellfläche aus Abb. 3.37 in Bezug gesetzt (s. Abb. 3.39). Bei allen adenoviral infizierten KMNR war eine höhere Proteinkonzentration zu beobachten ist. In EGFP koexprimierenden KMNR ist die RNA-Konzentration pro Zellfläche im Vergleich zu den Kontrollen, AdLacZ oder AdPPI-1 infizierten KMNR nahezu verdoppelt, dies spiegelt die leicht verminderte Zellfläche bei zugleich erhöhter RNA-Konzentration wieder.

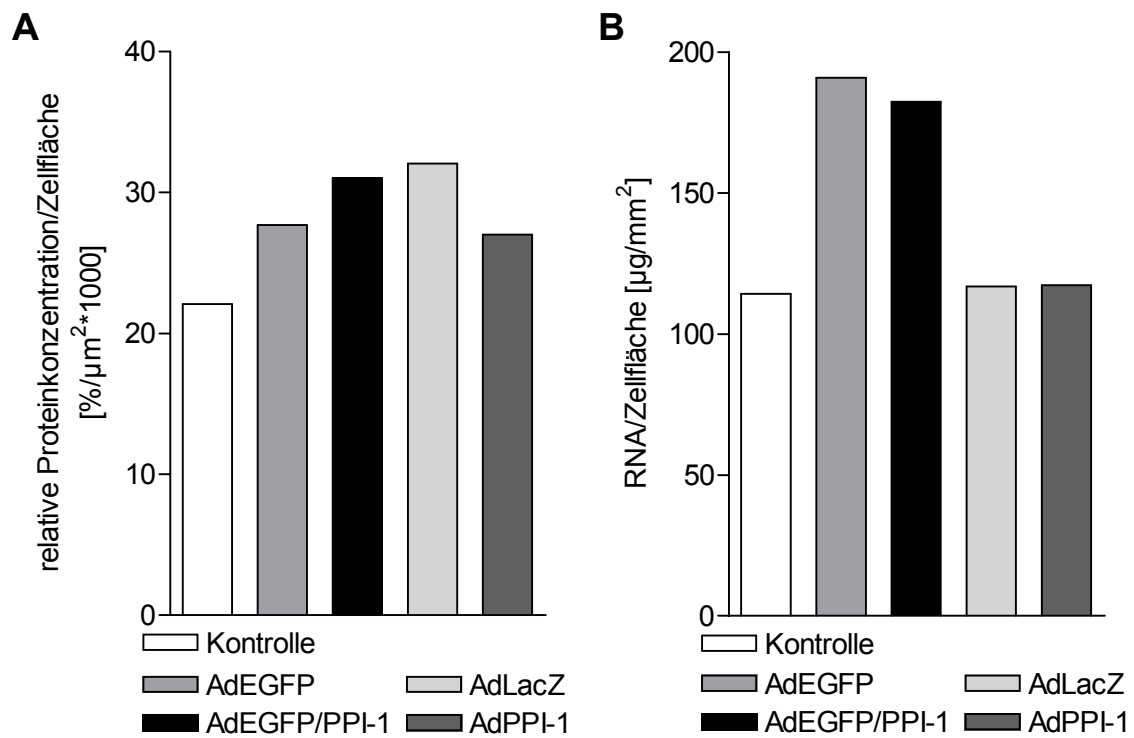


Abb. 3.39: Protein- (A) und RNA- (B) Konzentration in Bezug auf die Zellfläche.

In A gibt die Ordinate die Proteinkonzentration in % der Kontrollen, in B die RNA-Konzentration, jeweils bezogen auf die Zellfläche an.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Auswirkungen einer Überexpression von Protein Phosphatase Inhibitor-1 (PPI-1) in Kardiomyozyten neugeborener Ratten (KMNR) in Monolayerkultur und rekonstituiertem Gewebe auf deren Kontraktilität.

Hierbei wurden folgende Hauptergebnisse erzielt: (1) Die optimalen Bedingungen für den adenoviralen Gentransfer in EHT fanden sich bei der Infektion an Tag 10-12 mit einer MOI von 50-100 für 24-48 Stunden. (2) Die Überexpression von PPI-1 führte zur Sensitivierung der Kardiomyozyten gegenüber der Wirkung des β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin. (3) Die PPI-1 Überexpression führte zu einer deutlichen Steigerung der Phosphorylierung von Phospholamban-Serin¹⁶ sowie zu einer Erhöhung der p38-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von Phospholamban-Threonin¹⁷ nach Isoprenalinstimulation war hingegen erniedrigt. (4) In PPI-1 überexprimierenden KMNR war die cAMP-Konzentration nach Stimulation mit 1 nM Isoprenalin vermindert.

4.2 Auswahl der verwendeten Modelle

Um die Auswirkungen der Überexpression von PPI-1 in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde der adenovirale Gentransfer gewählt. Gegenüber den konventionellen Methoden mit Liposomen, Elektroporation, Calciumphosphat, DEAE-Dextran, retroviralem Transfer oder der direkten DNA-Injektion bietet der adenovirale Gentransfer eine sehr hohe Effizienz [144; 228].

Zudem können mit rekombinanten Adenoviren auch postmitotische, nichtreplizierende Zellen, also auch Kardiomyozyten, infiziert werden [144]. Die Proteinexpression ist schon nach 2-4 Stunden nachweisbar [76] und erreicht ihr Maximum nach etwa 48 Stunden [138] (s. Abb. 3.15). Durch die bicistronische Koexpression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) kann die Infektionseffizienz durch dessen Epifluoreszenz im Mikroskop gut abgeschätzt werden (s. Abb. 3.12 und 3.13). In den Experimenten, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurden rekombinante Adenoviren verwendet, die *enhanced GFP* (EGFP) exprimieren. EGFP ist eine Variante des nativen GFP, die eine gelblichere, vor allem aber wesentlich stärkere Epifluoreszenz hervorruft und für die Expression in Säugetierzellen optimiert wurde [25]. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die adenovirale Infektion oder EGFP *per se* abschätzen zu können, wurden uninfizierte sowie mit einem EGFP bzw. β -Galactosidase kodierenden Virus infizierte Kardiomyozyten als Kontrollen mitgeführt.

Zur Erfassung der Kontraktionsparameter wurde das Modell des *engineered heart tissue* (EHT) gewählt. Das aus KMNR rekonstituierte Gewebe lässt sich in Kultur länger züchten als KMNR-Monolayer. Dies erlaubt die Differenzierung des Gewebes und der damit einhergehenden Entwicklung von Charakteristika, die für das Myokard adulter Ratten typisch sind [256]. Zudem können die Kardiomyozyten in der dreidimensionalen Kollagenmatrix Ausläufer bilden, Zellkontakte miteinander aufnehmen und sich so zu einem kohärent schlagenden Verband zusammenschließen, der den Bedingungen im Myokard ähnelt [256]. Sie lassen sich sehr effizient mit rekombinanten Adenoviren infizieren [255], wengleich für eine Infektionseffizienz von 100% eine fünfzig- bis hundertfach höhere Anzahl an Viruspartikel pro Zelle notwendig ist als für kultivierte KMNR (s. Abb. 3.17 und 3.18). Dies begründet sich wahrscheinlich aus dem gewebeartigen Verband, in den die KMNR eingeschlossen sind und wodurch die Viruspenetration der einzelnen Zelle erschwert wird. Die Kontraktions- und Relaxationseigenschaften der EHTs sind vergleichbar mit denen von Trabekeln (s. Abb. 2.8), wobei die Reaktion auf Calcium- oder Isoprenalinstimulation bei geringeren Konzentrationen einsetzt [256]. EHTs eignen sich somit gut für Kontraktionsmessungen und sind verhältnismäßig einfach und in kurzer Zeit (ca. 12-14 Tage)

herzustellen. Etwas nachteilig wirken sich die Schwankungen in der basalen und maximalen Kontraktionskraft aus (s. Abb. 3.24), die wahrscheinlich auf die chargendifferente Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und qualitative Unterschiede der Zellpräparation zurückzuführen sind.

4.3 PPI-1 mRNA-Sequenz in verschiedenen Gewebearten

Bei der Sequenzierung der PPI-1-cDNA fiel im Vergleich zu den bereits veröffentlichten Sequenzen des menschlichen Gehirns, der quergestreiften Muskulatur der Ratte und des Kaninchens [82] ein Basenaustausch auf. Dies wurde in einer zyklischen Sequenzierung von PPI-1-cDNA aus der quergestreiften Muskulatur der Ratte sowie aus gesunden Menschen- und Rattenherzen überprüft. Beim kardialen PPI-1 der Ratte zeigte sich Guanin⁸⁵ durch Adenin ersetzt, was zum Austausch der sauren Aminosäure Glutamat²⁷ ($pK \approx 4,7$) gegen das basische Lysin ($pK \approx 10,2$) führt (s. Abb. 3.2). Die Sequenzen der menschlichen Herzproben hingegen stimmten mit der von PPI-1 aus dem menschlichen Gehirn [83] überein. Diese Variation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden, so dass unklar bleibt ob es sich um eine echte Punktmutation oder um einen Genpolymorphismus handelt. Da wir letzteres vermuteten und uns Proben aus insuffizienten, menschlichen Herzen zu Verfügung standen, untersuchten wir in diesen die Sequenz von PPI-1. Diese zeigten keinen Unterschied zur publizierten Sequenz aus dem menschlichen Gehirn, so dass eine Bedeutung in der Herzinsuffizienz unwahrscheinlich erscheint und ein Polymorphismus nicht bestätigt werden konnte. Auch DARPP-32, ein Strukturhomolog von PPI-1, das lediglich in der Erkennungssequenz der Proteinphosphatase 1 (PP1) und der Threoninphosphorylierung mit PPI-1 übereinstimmt, hat das entsprechende Glutamin konserviert [246] (s. Abb. 1.3). Eine Bedeutung hinsichtlich der PP1-Bindung ist eher unwahrscheinlich, da die Aminosäuren 20-30 eine amphipatische Helix bilden [9] und so nur hydrophobe oder hydrophile Reste eine Rolle spielen. In einer schriftlichen Korrespondenz mit Dr. Angus Nairn ([173], Yale University, School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA), der mehrere *in vitro* Mutagenesestudien an DARPP-32 geleitet hat [148; 124], teilt Dr. Nairn diese Meinung. Etwas näher liegt die Bindungsstelle der PKA für die Phosphorylierung an Threonin³⁵. Für die PKA wurde jedoch mehrfach gezeigt, dass ein Arginin unter den drei Aminosäuren, die N-terminal vor dem zu phosphorylierenden Threonin oder Serin liegen, wobei mindestens eine Aminosäure dazwischen liegen muss, ausreicht, um eine effiziente Bindung zu gewährleisten [89; 39]. Der Aminosäureaustausch dürfte hierbei ebenfalls keine Rolle spielen. Auch funktionell scheint der Austausch ohne große Bedeutung zu sein, da die benötigte Konzentration zur halbmaximalen Hemmung (IC_{50}) der PP1 von 39,85 nM an phosphoryliertem PPI-1 den hierzu ver-

öffentlichen Werten von etwa 35-40 nM [84] entspricht. Für eine zuverlässige Aussage über die Signifikanz des Austausches müssten Experimente mit einer Glutamat²⁷- und einer Lysin²⁷-Mutante unter gleichen Reaktionsbedingungen gemacht werden.

4.4 Effekte auf die Aktivität der Proteinphosphatase 1

4.4.1 Beeinflussung der Proteinphosphatase 1 durch PPI-1

In dieser Arbeit konnte die Inhibition der Proteinphosphatase 1 (PP1) in Zellysaten durch rekombinanten PPI-1 bestätigt werden (s. Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu war die endogene PP-Aktivität in AdPPI-1 und AdEGFP/PPI-1 infizierten Kardiomyozyten neonataler Ratten (KMNR) bei nachgewiesener PPI-1-Überexpression sowohl basal als auch isoprenalinstimuliert um etwa ein Drittel erhöht. In Zellen, die EGFP und PPI-1_(-1-65, T35D) - einer konstitutiv aktiven (T35D), trunkierten (Aminosäuren -1-65) Mutante [83] – koexprimieren, konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, die Tendenz zeigte jedoch eine Verminderung der Aktivität (s. Abb. 3.21).

PPI-1 wurde 1976 von Huang und Glinsmann als hitze- und säurestabiles, trypsinlabiles Protein entdeckt, welches in phosphorylierter Form aktiv ist und die Phosphorylase Phosphatase konzentrationsabhängig hemmt [123]. Weitere Untersuchungen hatten die Hemmung der PP1 durch PPI-1 *in vitro* mit nativem, aktiviertem Protein, das eine IC₅₀ von 1-3 nM aufweist [83; 24] und in Zellhomogenaten [103] bestätigt. Carr et al. hingegen konnten in PPI-1 *knock out* Mäusen *in vivo* ohne β -adrenerge Stimulation keinen Einfluss auf die PP1-Aktivität nachweisen [41]. Für den konstitutiv aktiven PPI-1_(-1-65, T35D) wurde diese Inhibition sowohl *in vitro* mit rekombinantem Protein, welches eine IC₅₀ von 235 nM hat [83], als auch *in vivo* [185] gezeigt.

Überraschenderweise zeigte der unphosphorylierte, rekombinante PPI-1 bereits ab einer Konzentration von 0,5 μ M eine PP1-Hemmung (s. Abb. 3.20). Da die Untersuchungen in Zellhomogenaten durchgeführt wurden, könnte phosphorylierter, endogener PPI-1 oder eine geringe Restaktivität der PKA dafür verantwortlich sein. Dagegen spricht jedoch die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts. Endo et al. [83] hatten an Stelle von unphosphoryliertem PPI-1 die Mutante PPI-1_(T35A), bei der Threonin³⁵ durch das nicht phosphorylierbare Alanin ersetzt ist, untersucht. Hierbei konnten sie auch bei Konzentrationen bis 50 μ M PPI-1_(T35A) keine PP1-Inhibition nachweisen. Alanin besitzt allerdings nur eine kleine Methylgruppe am Aminocarboxylgerüst, während Threonin mit einem Ethanolrest ausgestattet ist [6]. Da PPI-1 seine Struktur nach der Phosphorylierung beibehält [83] und die Inhibition der PP1 nur durch Blockierung der katalytischen Region durch den nach Phosphorylierung verlängerten Threoninrest erfolgt [9], könnte es sein, dass unphospho-

rylierter PPI-1 die Substratdephosphorylierung nicht unterbindet, aber zumindest stärker beeinträchtigt als PPI-1_(T35A). Die Untersuchungen sind also nicht direkt vergleichbar. Bibb et al. [24] konnten bei einer Konzentration bis zu 1 μM an unphosphoryliertem PPI-1 keine PP1-Inhibition finden. Da also höhere Konzentrationen bisher nicht ausreichend untersucht wurden, widerspricht die PP1-Hemmung durch rekombinanten, unphosphorylierten PPI-1 mit einer IC_{50} von 1,7 μM nicht unbedingt den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Da die bisher gemessene, maximale PPI-1-Gewebekonzentration 1 μM beträgt [178], würde dies *in vivo* keine Rolle spielen.

Da das rekombinante Protein und die rekombinanten Adenoviren dieselbe cDNA kodieren und der korrekte Einbau durch Sequenzierung überprüft wurde, ist der konträre Effekt der erhöhten PP-Aktivität in PPI-1-überexprimierenden KMNR eher durch zelluläre Einflussmöglichkeiten zu erklären. Als Ursachen kommen deshalb viele zelluläre Reaktionen und Gegenregulationen oder aber technische Fehlerquellen in Frage, von denen die am nahe liegendsten im Folgenden zusammengefasst und anschließend diskutiert werden.

- a) Die Proteinüberladung stört die Zellfunktion.
- b) Eine subzelluläre Umverteilung (Kompartimentierung) von PP1c entzieht diese dem Zugriff des PPI-1.
- c) Im Überschuss vorhandener, unphosphorylierter PPI-1 verdrängt kompetitiv phosphorylierten PPI-1 aus der Bindung mit PP1c.
- d) Weitere Phosphorylierungen von PPI-1 beeinflussen die inhibitorische Fähigkeit des Proteins.
- e) Eine Hochregulation der PPs vermindert die PPI-1 Wirkung oder hebt sie auf.
- f) Durch die fehlende Differenzierung zwischen PP1 und PP2A bei der Messung der PP-Aktivität lässt sich der Beitrag der PP2A nicht einschätzen.

a) Die Proteinüberladung stört die Zellfunktion.

Die intrazelluläre Proteinüberladung kann die Zellfunktion und auch die PP1/PPI-1 Interaktion stören. Sowohl PPI-1 [133] als auch das häufig koexprimierte EGFP reichern sich gemeinsam mit vielen anderen Proteinen im Zytosol, GFP auch im Nucleus [249], an. Für eine kräftige Fluoreszenz werden etwa eine Million GFP-Moleküle [63], von EGFP immerhin noch etwa 29.000 [25] pro Zelle benötigt. Da die Multiplizität der Infektion (MOI) über die Fluoreszenz bestimmt und die Proteine unter Kontrolle des starken CMV-Promotors exprimiert wurden, kann von einem sehr hohen Proteingehalt an PPI-1 und EGFP in der Zelle ausgegangen werden (s. Abb. 3.13 und 3.15). O'Donnel et al. zeigten weiter, dass die adenovirale Expression der SERCA in KMNR mit serumhaltigem Medium zu einer gesteigerten Proteinsynthese und Zellhypertrophie führt, wie sie auch unter Einfluss des Hypertrophieinduktors Phenylephrin [216; 253; 227] beobachtet wird [181]. Vermutlich handelt es sich dabei um eine generelle Erhöhung des Zellstoffwechsels und der Proteinproduktion durch die Virusinfektion *per se*. In den hier untersuchten KMNR zeigten alle EGFP-exprimierenden Zellen eine verminderte Zellfläche im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen, AdLacZ- oder AdPPI-1-infizierten KMNR (s. Abb. 3.37), während die RNA-Konzentration deutlich erhöht war (s. Abb. 3.38). Die Proteinkonzentration war in EGFP-exprimierenden KMNR im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen nur leicht erhöht, während die von β -Galactosidase und PPI-1-überexprimierenden KMNR stark erhöht war (s. Abb. 3.38). Bezogen auf die Zellfläche zeigten alle virusinfizierten KMNR eine erhöhte Proteinkonzentration im Vergleich zu Uninfizierten (s. Abb. 3.39). Krestel et al. beobachteten bei der Koexpression von β -Galactosidase und EGFP im ZNS transgener Mauslinien eine letale Muskelschwäche [146]. Hierbei ging die Erhöhung verschiedener Apoptosemarker mit der Expression von EGFP, vermindertem Zellvolumen und Gewebedestruktion einher. Antikörper gegen EGFP, β -Galactosidase und Ubiquitin zeigten eine Aggregation von EGFP und β -Galactosidase sowie deren Kolokalisation mit Ubiquitin, so dass der Verdacht nahe liegt, dass die beiden Proteine von Ubiquitin für den proteolytischen Abbau durch das Proteasom markiert wurden [146]. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) übernimmt die zelluläre Qualitätskontrolle, indem es falsch gefaltete oder zusammengebaute und beschädigte Proteine, die sonst toxische Aggregate bilden können, abbaut [115; 116; 99]. Eine Störung des UPS wird bei neurodegenerativen Erkrankungen vermutet [49], bei denen eine „Verstopfung“ durch Proteinaggregate als Ursache angenommen wird [13; 113; 121; 14]. EGFP scheint also eine Neigung zur Aggregation aufzuweisen. Aber auch PPI-1 selbst könnte diese Eigenschaft besitzen. Mit seiner ungeordneten Sekundärstruktur und der randomisiert spiraligen Form ist PPI-1 ein natürlicherweise ungefaltetes Protein. Zu dieser Proteinklasse gehören auch jene, die durch ihre

leichte Aggregation neurodegenerative Erkrankungen verursachen [237]. Die Hemmung des UPS in einem Kompartiment dehnt sich auf andere Kompartimente aus, so dass nach erfolgter, initialer Blockade unabhängig vom Entstehungsort der Proteinkonglomerate das UPS in der gesamten Zelle „verstopft“ [14]. So wäre es denkbar, dass es durch den hohen Gehalt oder den schnellen Anstieg der zur Aggregation neigenden Proteine in der Zelle zur Bildung von Proteinaggregaten kam. Zu den endogenen Substraten des UPS gehören viele Schlüsselregulatoren der Apoptose und Proteine, die deren Ausführung gewährleisten [135], so dass ein verminderter Abbau dieser Proteine zum Zelltod führt. Ferner könnten Proteinkonglomerate *per se* zu mechanischen Störungen der intrazellulären Kommunikation, des Zytoskeletts oder der Interaktion zwischen Proteinen führen. Um derartige funktionelle Störungen auszuschließen, müssten Untersuchungen zur Aktivierung des UPS durchgeführt werden.

- b) Eine subzelluläre Umverteilung (Kompartimentierung) von PP1c entzieht diese dem Zugriff des PPI-1.

Ein weiterer Punkt ist eine potentielle Umverteilung der PP1 in subzelluläre Kompartimente. Noch vor zwanzig Jahren war die Wissenschaft von der Vorstellung geprägt, lösliche Proteine würden frei in der Zelle „umherschwimmen“. Heute jedoch ist bekannt, dass viele Proteine zu funktionellen Komplexen zusammengeschlossen sind, deren Funktionen über Botenstoffe aktiviert oder inhibiert werden. Ein gutes Beispiel dafür ist der Ryanodinrezeptorkomplex, der sich im Herzen aus mindestens sechs verschiedenen Proteinen zusammensetzt, darunter die cAMP- und calcium/calmodulinabhängigen Proteinkinasen (PKA, CaMK II), PP1, PP2A und ein lokalisierendes Protein [161; 22]. Die PKA wird über A Kinase ankernde Proteine (AKAP) an verschiedene Effektoren gebunden [203; 247]. Ebenso wird die PP1 durch lokalisierende Untereinheiten an subzelluläre Kompartimente gebunden [57]. Dort wird sie zum Teil dem Angriff anderer Proteine entzogen und kann ihre Funktion in diesem speziellen Kompartiment erfüllen [231]. Die durch die lokalisierende Untereinheit G_M an Phospholamban gebundene PP1 [16] wird im Gegensatz zur frei im Zytosol vorliegenden PP1c, von PPI-1 nur sehr schwach gehemmt [225]. Die Kompartimentierung bietet also die Möglichkeit, Proteine selektiv zu aktivieren und zu deaktivieren. Boknik et al. fanden dazu in Ratten nach β -adrenerger Langzeitstimulation eine Erhöhung der PP-Aktivität, die funktionell an das Sarkoplasmatische Retikulum geknüpft ist [27]. Im Einklang dazu ist die Aktivität der PP1 in Herzmuskelhomogenaten gesunder und herzinsuffizienter Menschen gleich, während sie in Membranpräparationen insuffizienter Ventrikel mehr als das Doppelte beträgt [176]. Bei den hier diskutierten Untersuchungen wurde die PP-Aktivität in Zellhomogenaten gemessen. Die Bindung der PP1 an subzelluläre Kompartimente, bei der sie der Beeinflussung des PPI-1 größtenteils entzogen wird,

könnte die gesteigerte Aktivität in den Zellhomogenaten verursachen. Für eine Differenzierung müsste eine Messung der PP1-Aktivität in Membranpräparationen durchgeführt werden.

- c) Im Überschuss vorhandener, unphosphorylierter PPI-1 verdrängt kompetitiv phosphorylierten PPI-1 aus der Bindung mit PP1c.

Die adenovirale Überexpression von PPI-1 könnte auch dazu führen, dass nicht phosphorylierter PPI-1 im Überschuss vorhanden ist. Dieser bindet ebenfalls an PP1, vermittelt jedoch keine oder nur eine sehr schwache Inhibition [83; 103; 24]. Die Dissoziationskonstante von Dephospho-PPI-1 ist gegenüber der von Phospho-Thr³⁵-PPI-1 nur verdoppelt [83]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die starke isoprenalinabhängige Phosphorylierung von PPI-1 an Threonin³⁵ in KMNR mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (DARPP-32, [218]) sicher nachgewiesen (s. Abb. 3.19). Dennoch kann es sein, dass die Mehrheit der PPI-1 Moleküle unphosphoryliert vorliegt und eine kompetitive Verdrängung des aktiven PPI-1 aus der PP1-Bindung bewirkt. Da hierbei auch endogenes PPI-1 betroffen wäre, könnte eine Enthemmung der PP1 zu deren erhöhter Aktivität beitragen. Allerdings müsste PPI-1_(-1-65, T35D), als konstitutiv aktives Protein [83] die PP1-Aktivität auch ohne Isoprenalinstimulation inhibieren. Die IC₅₀ von PPI-1_(-1-65, T35D) ist knapp 250-mal höher als die von phosphoryliertem Wildtyp-PPI-1 [83]. Dies wurde sowohl *in vitro* mit rekombinantem Protein [83], als auch *in vivo* bei 25-fach PPI-1_(-1-65, T35D) überexprimierenden transgenen Mäusen gezeigt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen war die Aktivität der PP1 jedoch nur um 15% verringert [185].

- d) Weitere Phosphorylierungen von PPI-1 beeinflussen die inhibitorische Fähigkeit des Proteins.

PPI-1 selbst unterliegt einer sehr komplexen, endogenen Regulation, deren Beeinflussung hier zur Aktivitätssteigerung der PP1 führen könnte. Bei DARPP-32, einem Strukturholog von PPI-1, ist die endogene Regulierung über verschiedene Kinasen und Phosphatasen an unterschiedlichen Aminosäureresten gut untersucht [69-71]. Bei PPI-1 gab es dazu bis vor kurzem nur wenig publizierte Daten. Obwohl Serin⁶⁷ mit einer Sättigung von gut zwei Drittel der Phosphatbindungsstellen *in vivo* sehr viel häufiger phosphoryliert vorgefunden wird als Threonin³⁵ [4; 83], lag der Schwerpunkt der Forschung auf der PKA-abhängigen Phosphorylierung, deren Bedeutung in Bezug auf die Aktivität von PPI-1 intensiver untersucht worden war [123; 179; 83]. Die Ursache mag darin liegen, dass PKA an Serin⁶⁷ nur sehr langsam phosphoryliert wird [4]. Zudem reicht das Fragment der Aminosäuren 9-54 zur vollständigen Hemmung der PP1 aus [5], wodurch dem C-terminalen Ende des PPI-1 hinsichtlich der PP1-Inhibition keine große inhibitorische Bedeutung bei-

gemessen wurde [4]. Kürzlich rückte Serin⁶⁷ wieder ins Blickfeld der Forschung.

Zunächst fanden Huang und Paudel in Gehirnextrakten von Rindern, dass rekombinanter PPI-1 an Serin⁶⁷ durch die neuronale cdc2-like Proteinkinase (NCLK) phosphoryliert wird. Deren Ergebnissen zufolge hemmt der an Serin⁶⁷ phosphorylierte PPI-1 die PP1 in äquivalenter Weise wie an Threonin³⁵ oder dual phosphorylierter PPI-1 [125]. Später zeigten Bibb et al., dass PPI-1 in Gehirnschnitten an Serin⁶⁷ phosphoryliert wird. Ein Einfluss auf die PP1-Aktivität durch die Serin⁶⁷-Phosphorylierung konnte weder bei dem zusätzlich an Threonin³⁵, noch bei isoliert an Serin⁶⁷ phosphoryliertem PPI-1 nachgewiesen werden. Die Serin⁶⁷-Phosphorylierung schwächte lediglich die Eigenschaften von PPI-1 als PKA-Substrat geringfügig ab, so dass sie eher für die Feinregulation der PKA-Aktivierung in Frage käme. Sie könnte auch eine lokalisierende Eigenschaft, eine völlig unbekannt Funktion des PPI-1 oder eine regulierende Funktion nur im Komplex mit anderen Proteinen vermitteln [24]. Im Herzen wurde erst vor kurzem die Phosphorylierung an Serin⁶⁷ durch die PKC α postuliert. Braz et al. zeigten in einem *knock out* und einem transgenen PKC α Mausmodell eine Hyper- bzw. Hypokontraktibilität, als deren Ursache sie die um ein Drittel bis um die Hälfte erniedrigte bzw. erhöhte PP1-Aktivität eruierten. Diese Ergebnisse konnten in kultivierten Kardiomyozyten bestätigt werden. Durch Immunopräzipitation wurde ferner die um die Hälfte bis zwei Drittel reduzierte bzw. erhöhte PP1c/PPI-1 Interaktion in PKC α - bzw. dominant-negative PKC α -überexprimierenden Kardiomyozyten nachgewiesen. Die PKC α -abhängige Phosphorylierung von PPI-1 und einer PPI-1_{S67A}-Mutante ergab nur halb soviel Phosphat einbau in die Mutante, wodurch auf mindestens zwei Phosphorylierungsstellen von Seiten der PKC α geschlossen werden kann [30]. Die eindeutige Klärung der Serin⁶⁷-Phosphorylierung des PPI-1 steht bis *dato* noch aus, sie könnte aber in den hier durchgeführten Untersuchungen eine Rolle gespielt haben. Eine Hemmung der PP1 Inhibition durch die PKC α -abhängige Phosphorylierung von PPI-1 könnte sowohl durch Serin⁶⁷ als auch durch die zweite, nicht genauer lokalisierte Aminosäure vermittelt werden [30]. Desweiteren könnte die Bindung von PPI-1 an PP1 durch die Phosphorylierung von Aminosäuren, welche die Bindungsstelle umgeben, verhindert werden. Wäre die Phosphorylierung an Serin⁶⁷ alleine für die verminderte PP1-Hemmung verantwortlich, so dürfte dies keinen Einfluss auf die Hemmung der PP1-Aktivität in den KMNR haben, die den trunkierten und konstitutiv aktiven PPI-1 überexprimieren. Als weiteres PKC-Substrat käme Serin⁶ in Frage, das ebenfalls in der PKC-Konsensussequenz pSer-x-Lys/Arg [139; 186] liegt. Da PPI-1 ein ungeordnetes [52; 83] und natürlicherweise ungefaltetes [237] Protein ist, ist es wahrscheinlich, dass sich das Konsensusmotiv an der Oberfläche befindet und die PKC binden kann. Dementsprechend erreichte Serin⁶ bei der Berechnung der Phosphorylierungswahrscheinlichkeit mittels eines Prädiktionspro-

grammes [174; 26] eine sehr hohe Punktezahl, höher als die von Threonin³⁵. Unterdessen wurde diese Theorie von Bibb et al. experimentiell bestätigt [177]. Serin⁶ befindet sich nur drei Aminosäuren N-terminal des Konsensusmotives für die PP1. Eine Störung der Interaktion zwischen PPI-1 und PP1 durch die Phosphorylierung an Serin⁶ wäre also durchaus denkbar. Untersuchungen von Mutanten des Strukturhomologes DARPP-32 haben gezeigt, dass die Abspaltung des N-terminalen Endes bis auf zwei Aminosäuren vor dem PP1-Bindungsmotiv – KIQF - eine fünffache Erhöhung der IC₅₀, die komplette Entfernung eine 17-fach erhöhte IC₅₀ mit sich bringt [148]. Das N-terminale Ende übt also Einfluss auf die PP1c/PPI-1-Bindung aus und würde dies in gleichem Maße bei PPI-1_(-1-65,T35D) tun. Falls eine Phosphorylierung an beiden Serinresten zur Störung der Interaktion führt, würde sich dies stärker auf PPI-1 als auf PPI-1_(-1-65,T35D) auswirken. In diesem Fall wäre die beobachtete starke Erhöhung der PP1-Aktivität durch PPI-1 gegenüber der teilweise gehemmten und teilweise erhöhten PP1-Aktivität durch PPI-1_(-1-65,T35D) (s. Abb. 3.21) erklärbar und dessen Wirkung möglicherweise Folge unterschiedlicher PKC-Aktivierungen. Weitere Untersuchungen müssten klären, ob die Phosphorylierung an Serin⁶⁷ oder an Serin⁶ eine Rolle spielt und auf welche Art und Weise sie Einfluss auf die PP1-Aktivität nehmen.

e) Eine Hochregulation der PPs vermindert die PPI-1 Wirkung oder hebt sie auf.

Eine kompensatorische Hochregulation von Phosphatasen könnte zum einen über die vermehrte Dephosphorylierung des PPI-1 durch Calcineurin oder PP2A [54; 81], zum anderen durch eine erhöhte PP1-Konzentration zu erhöhter PP1-Aktivität führen. Pathak et al. [185] fanden in transgenen PPI-1_(1-65, T35D) Mäusen keine gegenregulatorische Erhöhung der PP2A-Aktivität und die PP1-Proteinkonzentration entsprach derjenigen in Wildtyp-Mäusen. Unter Anwesenheit von Calcium bestreitet Calcineurin 70-90% der Dephosphorylierung des PPI-1 [223; 54]. Auch Braz et al. fanden in transgenen Mäusen, welche die PKC α überexprimierten, eine PPI-1-vermittelte Inhibition der PP1-Aktivität um ein Drittel bei unveränderter PP1c Konzentration [30]. Kirchhefer et al. hingegen zeigten in transgenen Mäusen, die herzspezifisch eine trunkierte, inhibitorisch aktive Form des PPI-2 überexprimierten, bei supprimierter PP-Aktivität eine sechsfache Erhöhung des PP1 α -Gehaltes der Kardiomyozyten [143]. Ergebnisse von Florian Weinberger aus unserer Arbeitsgruppe zeigen in PPI-1-überexprimierenden, transgenen Mäusen eine zwei- bis dreifache Erhöhung der PP1-Konzentration (Daten noch nicht veröffentlicht). Ein Problem bei der Evaluation der PP-Aktivität besteht in der Diskrepanz zwischen *in vivo* Daten und den fehlenden technischen Mitteln, die Aktivität *in vivo* zu messen. Sie muß letztendlich *in vitro* bestimmt werden. Die PP1-Aktivität reagiert sehr sensibel auf Milieuänderungen und fällt innerhalb einer halben Stunde *post mortem* um 85-95% ab [158], so

dass Variationen und Fehlerquellen auch bei präziser Arbeitsweise nicht auszuschließen sind. Während es die Möglichkeit der kompensatorischen Hochregulation noch genauer zu untersuchen gilt, zeigen neonatale Tiere schon physiologischerweise eine höhere Expression und Aktivität der PP1 und der PP2A als adulte Tiere. In den Ventrikeln neugeborener Tiere wurde gezeigt, dass der mRNA Gehalt der PP1- und PP2A-Isoformen sowie die Proteinkonzentration der PP2A um mindestens 50%, die Proteinkonzentration der PP1 dreifach höher sind als bei erwachsenen Tieren [101; 147]. Zur Klärung, ob eine Hochregulation der PPs in der vorliegenden Arbeit vorhanden war, müsste die Konzentration der Phosphatasen und die Aktivität der PP2A und 2B unter diesen Versuchsbedingungen bestimmt werden.

- f) Durch die fehlende Differenzierung zwischen PP1 und PP2A bei der Messung der PP-Aktivität lässt sich der Beitrag der PP2A nicht einschätzen.

Da in vielen Untersuchungen zur kardialen PP-Aktivität die PP2A sowohl in pathologischen Veränderungen als auch durch Isoprenalinstimulation unverändert blieb, gingen wir davon aus, dass die Bestimmung der kumulativen Aktivität von PP1 und PP2A einen relativen Wert ergibt, der sich proportional zur PP1-Aktivität verhält. Im Herzen wurde gezeigt, dass PP1 und PP2A mit über 90% für den Hauptteil der PP-Aktivität verantwortlich sind [54; 158]. Dabei wird die phospholambanassoziierte PP-Aktivität mit einem Anteil von 90% durch die PP1 dominiert [158; 220]. Die calcium- und magnesiumabhängigen PP2B und 2C wurden in dem für die Messung verwendeten calcium- und magnesiumfreien Medium nicht aktiviert bzw. durch die Zugabe des Chelators EDTA gehemmt [24]. Für den Anteil der PP2A-Aktivität konnte gezeigt werden, dass er in den Herzen chronisch isoprenalinstimulierter Tiere konstant bleibt [27; 105]. Kürzlich jedoch wurde eine cAMP-abhängige PP2A-Aktivierung beschrieben, die PKA-unabhängig ist und zur Dephosphorylierung vieler Proteine führt [90]. Außerdem offenbarte ein transgenes PP2A Mausmodell, dass PP2A sowohl die Phosphorylierung von Phospholamban als auch die von Troponin I vermindert [97]. Es könnte somit sein, dass zum einen die PP2A durch hier nicht untersuchte Mechanismen in den KMNR aktiviert wurde, zum anderen die PP2A im Herzen gegenläufig zur PP1 reguliert ist, dadurch PPI-1 wieder deaktiviert und es zu einer Enthemmung der PP1-Aktivität kommt. Beides hätte die hier gezeigte Aktivitätssteigerung der PP zur Folge.

4.4.2 Isoprenalininduzierte Effekte auf die PP-Aktivität

Da PPI-1 PKA-abhängig phosphoryliert wird [51; 4], untersuchten wir die Auswirkung der Isoprenalinstimulation auf die PP-Aktivität. Die β -adrenerge Stimulation führt durch Aktivierung von PKA zur Phosphorylierung zellulärer Phosphoproteine [199; 221; 20; 153]. Es

wird angenommen, dass die PKA die katalytische Untereinheit PP1c, welche durch die lokalisierende Untereinheit G_M an Phospholamban gebunden wird [16], phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung der PP1c dissoziiert diese in das Zytosol [118; 128; 240]. Im Zytosol wird die freie PP1c durch PPI-1, das selbst durch die PKA aktiviert wird [123; 83; 24], stärker gehemmt als die an G_M gebundene PP1c [225]. Im Einklang mit dieser Hypothese konnte eine isoprenalinabhängige Verminderung der PP1-Aktivität *in vitro* in isolierten Kardiomyozyten [103], in Membranpräparationen [104] sowie in perfundierten Herzen [3; 175] und *in vivo* in isoprenalinperfundierten Meerschweinchenherzen [104] gezeigt werden. Im Gegenzug fanden Carr et al. in perfundierten Herzen von PPI-1 *knock out* Mäusen nach Isoprenalinstimulation eine höhere PP1-Aktivität als in Wildtyp-Mäusen [41]. Bei unseren Messungen unterlag der Isoprenalinearbeit auf die PP-Aktivität starken, von der Zellpräparation abhängigen Schwankungen, so dass darüber keine klare Aussage gemacht werden kann (s. Abb. 3.21). Es konnte allerdings eine Halbierung der PP-Aktivität durch Zugabe von PKA in KMNR-Homogenaten gezeigt werden (s. Abb. 3.22)

Die gering ausgeprägte Isoprenalinantwort könnte durch die mit 1 nM zu niedrig gewählte Konzentration bedingt sein, die die Phosphorylierung von PPI-1 oder die Freisetzung der katalytischen Untereinheit der PP1 (PP1c) in das Zytosol nicht in ausreichendem Maße initiiert. Phosphothreonin³⁵-PPI-1 hemmt PP1 auch in der an die lokalisierende Untereinheit G_M gebundenen Form (PP1- G_M), allerdings weniger effizient und umso langsamer, je stärker Temperatur und Salzkonzentration von physiologischen Bedingungen abweichen [225]. In zwei identisch konzipierten Versuchsreihen mit isoliertem PPI-1 bzw. PP1- G_M aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen, die 250 µg Adrenalin injiziert bekamen, konnte gezeigt werden, dass sowohl die PPI-1-Phosphorylierung, als auch die PP1c-Konzentration im Zytosol von etwa einem auf zwei Drittel steigen [91; 118]. Eine Isoprenalin-Konzentration, die zu einer erhöhten Phosphorylierung von PPI-1 führt, müsste also auch eine ausreichende Menge an PP1- G_M phosphorylieren und dessen Dissoziation in das Zytosol zur Folge haben. In vielen Experimenten wurden jedoch weitaus höhere Isoprenalin-Konzentrationen als hier verwendet. So untersuchten Carr et al. [41] die PP1-Aktivität in PPI-1 *knock out* Mäusen bei 10 nM Isoprenalin, Gupta et al. [104] die PP-Aktivität in Kardiomyozyten von Meerschweinchen bei 1 µM Isoprenalin. Hier wurde mit 1 nM eine Konzentration nahe der EC_{50} gewählt, da diese in den Kontraktilitätsmessungen der EHTs (s. Abb. 3.25) und bei der Phosphorylierung von Phospholamban (s. Abb. 3.29) ausreichend war. Eine neue Versuchsreihe mit höheren Isoprenalin-Konzentrationen und Membranpräparationen müsste folgen, um der Klärung dieser Fragen näher zu kommen.

4.5 Effekte auf die kontraktile und biologische Parameter

4.5.1 Kontraktile Funktion

Die Auswirkungen von PPI-1 auf die Kontraktionskraft wurden in *engineered heart tissue* (EHT) [255; 256] untersucht. In EHT wurde PPI-1 und EGFP adenoviral überexprimiert. Als Kontrollen dienten adenoviral EGFP-überexprimierende und nicht infizierte EHT. Hierbei zeigte sich eine konstante Minderung der Kontraktionskraft über den gesamten Verlauf der Calcium- und Isoprenalinkontraktionskurven bei allen infizierten EHTs (s. Abb. 3.23 und 3.24).

Die Kontraktionskraft eines EHT ist abhängig von der Zellzahl und dem Aktivierungszustand der einzelnen Zelle, der Anzahl an Myofilamenten, der Ausreifung der Zellen und von Veränderungen im Expressionsmuster. So würde z.B. eine reduzierte Expression der Sarkoplasmatischen Retikulum ATPase eine Verminderung der Kraft bewirken. Da PPI-1-überexprimierende EHTs die größte Kraftminderung zeigten (s. Abb. 3.23), wirft dies die Frage auf, ob PPI-1 dafür verantwortlich sein könnte. Insgesamt zeigten die PPI-1 überexprimierenden EHTs eine starke Streuung der EC_{50} (s. Abb. 3.25 und 3.26). Hierbei wiesen die stark fluoreszierenden EHTs die breiteste Streuung auf (s. Abb. 3.27). Dies bestätigt den Verdacht, dass der Grad zwischen effektiver und unzureichender Überexpression sehr schmal ist und die effektive Konzentration nahe der Konzentration liegt, die bereits zytotoxische Nebenwirkungen hervorruft. Es kommen hierbei als Ursachen in Frage (1) die Proteinüberladung, die zu mechanischen Störungen in der Zelle führen kann, (2) zytotoxische Effekte durch EGFP und (3) negativ inotrope Effekte durch eine p38-Aktivierung.

Für die verminderte Kontraktionskraft könnte unter anderem die schon oben besprochene Proteinüberladung der Zelle eine Rolle spielen. Die Gradwanderung zwischen ausreichender und toxischer Infektion zeigten O'Donnell et al. sehr gut in adenoviral SERCA überexprimierenden KMNR, bei denen die Applikation von fünf Plaque formenden Einheiten (pfu) Virus pro Zelle für die Infektion aller Zellen nötig sind, während 5-6 pfu pro Zelle bereits zu erhöhter Apoptoserate und Zelltod führten. In EGFP überexprimierenden KMNR konnten sie diesen Effekt ebenfalls beobachten, wenn auch erst bei etwas höheren Viruskonzentrationen [181]. GFP verteilt sich im Nucleus und im Zytosol, wo es sich besonders in der Zellperipherie anreichert [210], so dass es hier eher Mikro- und Myofilamente behindern würde. Die Assoziation von GFP mit Mikrofilamenten nach der Fixation von Zellen wurde in mehreren Zelllinien gezeigt [210]. In lebenden Zellen gab es dafür bisher keinen Anhalt [210]. Eine derartige mechanische Behinderung würde auch die stärkere Minderung der Kontraktionskraft in EGFP/PPI-1 gegenüber nur EGFP exprimierenden EHTs erklären. Obwohl die Betrachtung lebender, EGFP überexprimierender

KMNR einen homogenen Eindruck vermittelte, wurde in der Untersuchung an fixierten KMNR eine inhomogene Infektion der Zellen offenkundig (s. Abb. 3.16). Dies dürfte in EHTs noch stärker ausgeprägt sein, da die Viren die Kollagenmatrix penetrieren müssen. So werden vermutlich KMNR in der Außenschicht einer besonders hohen Viruskonzentration ausgesetzt, die auch zum Zelltod führen könnte. Vorversuche, bei denen uninfizierte mit AdEGFP infizierten EHTs verglichen wurden, zeigten, dass vor allem die Dauer der Infektionszeit einen supprimierenden Effekt auf die Kontraktilität vermittelt, während die Infektionsstärke (MOI) eine geringere Rolle spielt. Es müssten weitere Experimente folgen, bei denen EHTs mit einem Adenovirus, das kein Protein zur Expression bringt, infiziert werden und daran die Quantifizierung der Apoptoserate sowie Untersuchungen der Zellarchitektur erfolgen, um zu differenzieren, ob die Virusinfektion *per se* oder die Proteinüberladung einen Einfluß auf die Vitalität der KMNR in EHTs ausüben.

Es könnte auch EGFP *per se* eine zytotoxische Wirkung vermitteln. Transgene Mäuse, die GFP unter dem herzspezifischen Promotor des α -Myosin der schweren Ketten exprimieren, entwickelten schon nach 8 Wochen dosisabhängig eine dilatative Kardiomyopathie mit erhöhtem Herzgewicht, Dilatation der vier Kammern, dünnem Myokard, organisierten linksventrikulären Thromben und starben im Alter von 4-5 Wochen [126]. Obwohl GFP und seine Varianten als Markerproteine in der Forschung eine weite Verbreitung gefunden haben und ihr Einsatz vielfach ohne Komplikationen möglich war, beobachteten verschiedene, unabhängige Arbeitsgruppen zytotoxische Wirkungen dieser fluoreszierenden Proteine [152; 96].

Neben den zytotoxischen Ursachen könnte für die Verminderung der basalen Kontraktilität auch die Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinase p38 verantwortlich sein. In Untersuchungen an kultivierten KMNR beobachteten wir wiederholt eine deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante, Erhöhung der p38-Phosphorylierung (s. Abb. 3.33). Liao et al. [151] zeigten in Kardiomyozyten adulter Ratten, die adenoviral die p38 spezifische MAPK Kinase MKK3bE überexprimieren, eine Verminderung der basalen Kontraktilität. In jenen, denen ein p38-Inhibitor verabreicht wurde, fand sich eine Erhöhung der Kontraktilität. Hierbei konnte keine Veränderung des Calciumeinstroms über den L-Typ Calciumkanal oder des intrazellulären Calciumtransienten gezeigt werden. Dies legt einen Mechanismus nahe, bei dem die Sensitivität der Myofilamente gegenüber Calcium verändert wird. Dafür kommen vor allem Veränderungen der Troponin I-Phosphorylierung und des pH-Wertes in Frage. Für beides konnte jedoch kein Zusammenhang mit der p38-Aktivität hergestellt werden, so dass die Verknüpfung zwischen p38-Aktivierung und negativer Inotropie vorerst noch unbekannt bleibt [151].

Bei der Konzentrationswirkungskurve mit Isoprenalin zeigte sich eine Linksverschiebung der Kurve (EC_{50} in AdEGFP/PPI-1 0,82 nM, in AdEGFP 1,20 nM, in Kontrollen 2,52 nM, s. Abb. 3.25 und 3.26).

Die Isoprenalinsensibilisierung der AdEGFP infizierten EHTs wurde überraschenderweise schon in vielen Vorversuchen zur Etablierung der Infektionszeit, -dauer und -stärke beobachtet und scheint ein sehr stabiler Effekt zu sein. Zu ähnlichen Erkenntnissen kam bereits eine andere Arbeitsgruppe in kultivierten KMNR, die mit einem adenoviralen Leervektor infiziert wurden. Hier führte die adenovirale Infektion zu einer Verringerung der EC_{50} in Bezug auf die Schlagfrequenz von 6,8 nM auf 1,8 nM Isoprenalin [180]. Dies korrelierte mit einer fünffachen Erhöhung der G_s -mRNA und einer Verdreifachung der G_s -Proteinkonzentration. Die funktionellen Auswirkungen dieser erhöhten G_s -Proteinkonzentration konnten selbst durch eine G_s -Überexpression nicht weiter gesteigert werden [180]. Zur Überprüfung einer Beeinflussung der G-Proteine durch die adenovirale Infektion in den hier diskutierten Experimenten wurde mittels Immunoblot die relative Proteinkonzentration von G_s und G_i in AdEGFP-infizierten und uninfizierten KMNR ermittelt. Hierbei konnten jedoch für beide Proteine keine Unterschiede nachgewiesen werden (s. Abb. 3.34). Der cAMP-Gehalt in AdEGFP-infizierten KMNR war jedoch gegenüber uninfizierten Kontrollen sowohl basal als auch nach Stimulation mit Isoprenalin erhöht, während die katalytische Potenz der Adenylylcyclase - gezeigt durch die direkte Stimulation mit Forskolin - unverändert war (s. Abb. 3.35). Der zu Grunde liegende Mechanismus der Linksverschiebung in AdEGFP infizierten EHTs bleibt vorerst ungeklärt.

Die Hypothese der Aktivierung von PPI-1 durch die PKA mit anschließender Hemmung der PP1 [123; 83; 24] könnte die hier gezeigte, erhöhte Isoprenalinsensitivität PPI-1 überexprimierender EHTs erklären. PPI-1 amplifiziert die β -adrenerge Wirkung, bei einer PPI-1 Überexpression können mehr PP1-Moleküle gehemmt werden und die Verstärkung des β -mimetischen Effektes tritt deutlicher zum Vorschein. Dass es hier zu keiner Kontraktilitätssteigerung (s. Abb. 3.23) oder positiven Lusitropie (s. Abb. 3.28) kam, passt nicht zu der oben aufgestellten Hypothese. Mögliche Gründe hierfür wurden bereits oben diskutiert. Die beobachtete Arrhythmie unter Isoprenalin in AdEGFP/PPI-1 infizierten EHTs ist ein weiteres Indiz, dass PPI-1 ein Verstärker der cAMP-vermittelten Effekte ist. Für Arrhythmien gibt es in Kardiomyozyten verschiedene Ursachen. Sie können ausgelöst sein durch eine Hypercalciämie, Hypokaliämie oder Sympathikomimetika. PPI-1 hätte die Wirkung eines leichten Sympathikomimetikums, so dass die Arrhythmien eine Art Bestätigung der gesteigerten Sensibilität gegenüber dem β -Agonisten Isoprenalin widerspiegeln.

4.5.2 Molekulare Parameter

4.5.2.1 Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad von Phospholamban

Um die Auswirkungen der PPI-1 Überexpression auf den Phosphorylierungszustand zellulärer Proteine zu ermitteln, wurde mittels phosphospezifischer Antikörper der Phosphorylierungsgrad von PLB in kultivierten KMNR untersucht. PLB kommt *in vivo* überwiegend als Homopentamer [47] mit 22 kDa vor, das durch Kochen in SDS in fünf Monomere aus je 52 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6,1 kDa zerfällt [215]. PLB wird an Serin¹⁶ durch die PKA und an Threonin¹⁷ durch die PKA und die CaMK II phosphoryliert [159]. Ein starker Einfluss der PP1-Aktivität und deren Regulation auf die PLB-Phosphorylierung wurde unter anderem in transgenen Mäusen, die PP1, PPI-1 oder die PKC überexprimierten sowie in PPI-1- oder PKC α -defizienten Mäusen nachgewiesen [41; 30; 185]. In dieser Arbeit führte die Stimulation von KMNR mit 0,01-100 nM Isoprenalin zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der PLB-Serin¹⁶-Phosphorylierung (s. Abb. 3.29). AdPPI-1 infizierte KMNR zeigten im Vergleich zu uninfizierten oder AdLacZ infizierten Zellen schon basal eine signifikant erhöhte Phosphorylierung an Serin¹⁶ (s. Abb. 3.31A). Nach Isoprenalinstimulation konnte auf Grund technischer Limitationen bei der densitometrischen Auswertung nur eine Tendenz dahingehend beobachtet werden (s. Abb. 3.31B). EGFP-exprimierende KMNR wiesen gegenüber uninfizierten Kontrollen basal eine erhöhte Phosphorylierung an Serin¹⁶ auf (s. Abb. 3.30A). In den isoprenalinbehandelten Zellen boten AdEGFP und AdEGFP/PPI-1 infizierte KMNR gegenüber den Kontrollen eine äquivalente, dezente Erhöhung, während in PPI-1_(-1-65, T35D) überexprimierenden KMNR eine signifikante Steigerung der PLB-Serin¹⁶-Phosphorylierung vorgefunden wurde (s. Abb. 3.30B). Die Evaluation der PLB-Phosphorylierung an Threonin¹⁷ zeigte überraschende Ergebnisse, da hier eine starke Verminderung in PPI-1 überexprimierenden KMNR beobachtet wurde (s. Abb. 3.32).

Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der erhöhten Serin¹⁶- jedoch erniedrigten Threonin¹⁷-Phosphorylierung nach Isoprenalinstimulation, könnten zum Teil durch das Bindungsverhalten der Antikörper bedingt sein. PT17 und PS16 wurden von vielen Arbeitsgruppen angewandt und die im folgenden diskutierten Ergebnisse verschiedener Publikationen über den Phosphorylierungsstatus von PLB entstanden unter Verwendung dieser Antikörper. Nach β -adrenerger Stimulation wird zuerst die Phosphorylierung von Serin¹⁶ und mit geringer zeitlicher Verzögerung die von Threonin¹⁷ erwartet [60]. Die Phosphorylierung an Threonin¹⁷ ist von der Aktivierung der CaMK II und dadurch von der Calciumkonzentration oder der Hemmung der PP1 abhängig [170; 239; 205]. Bei niedrigen Isoprenalinkonzentrationen verschiebt sich das Phosphorylierungsgleichgewicht in

Richtung dephosphoryliertes Threonin¹⁷ [205]. Unter dem Einfluss von PP1-Inhibitoren wie etwa Okadasäure verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch in die andere Richtung und die gesteigerte Threonin¹⁷-Phosphorylierung kann bei niedrigeren Isoprenalinkonzentrationen nachgewiesen werden [205]. Diese Untersuchungen wurden an adulten Ratten durchgeführt, bei denen die EC₅₀ um das 9- bis 18-fache höher liegt als bei neonatalen Tieren [11; 205]. Demnach sollte der Anteil an dual phosphoryliertem PLB unter 1 nM Isoprenalin und PPI-1-Überexpression in KMNR relativ hoch sein. Dieses wird aber von PS16 nicht erkannt [60; 162]. PT17 hingegen erkennt das doppelt phosphorylierte PLB [60], weist aber eine geringe Spezifität auf, so dass auch ein Teil des an Serin¹⁶ monophosphorylierten PLB mit diesem reagieren müsste. Die mit PT17 inkubierten Zellhomogenate sollten demnach eine weitaus höhere Phosphorylierung aufweisen als die mit PS16. Dies steht im Widerspruch zu den hier erzielten Beobachtungen, bei denen die Threoninphosphorylierung bei PPI-1-überexprimierenden KMNR unter Isoprenalinstimulation vermindert war (s. Abb. 3.32). Andere Untersuchungen zeigten, dass PT17 im *dot-blot* lediglich zwischen „phosphoryliert“ und „nicht phosphoryliert“ diskriminiert und nahezu keine Spezifität aufweist [162]. Aber auch dies ist nicht in Einklang mit der hier gezeigten, erhöhten basalen Phosphorylierung an Serin¹⁶ zu bringen. Die Isoprenalinkonzentration müsste mit 1 nM und die Calciumkonzentration mit 1,8-2,0 mM im Medium ausreichen, um bei vorhandener PP1-Hemmung durch die PPI-1 Überexpression eine Steigerung der Phosphorylierung an Threonin¹⁷ zu induzieren [205]. Andererseits konnte in KMNR in Anwesenheit des β -Rezeptorantagonisten Propranolol gezeigt werden, dass die alleinige PP1-Inhibition durch Okadasäure keine Erhöhung der Threonin¹⁷-, wohl aber der Serin¹⁶-Phosphorylierung bewirkt [11]. Desweiteren konnten Chu et al. in Kardiomyozyten von transgenen Mauslinien, die PLB_{S16A} auf PLB *knock out* Hintergrund exprimierten, selbst unter Kostimulation von je 1 μ M Isoprenalin und Okadasäure sowie Calciumzugabe keine Phosphorylierung an Threonin¹⁷ entdecken [48]. Zusammengefasst lässt sich die deutlich erniedrigte Threonin¹⁷- Phosphorylierung an PLB in PPI-1-überexprimierenden KMNR bis *dato* nicht erklären.

4.5.2.2 Auswirkungen auf die Phosphorylierung von p38

Neben der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der extrazellulär aktivierten Kinase (Erk) gehört auch p38 zu den stressabhängig aktivierten Proteinkinasen. Gemeinsam bilden sie die Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die Serin- oder Threoninreste phosphorylieren können [226]. Bei der Untersuchung des p38-Aktivierungszustandes zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der p38-Phosphorylierung unter Isoprenalinstimulation (s. Abb. 3.33A). Außerdem wiesen PPI-1- überexprimierende KMNR

eine nicht signifikant erhöhte p38-Phosphorylierung im Vergleich zu EGFP- oder β -Galactosidase-überexprimierenden Zellen auf (s. Abb. 3.33B/C).

Die MAPK werden aktiviert durch zellulären Stress und regulieren verschiedene Punkte der zellulären Entwicklung. Das primäre Substrat der p38 ist die MAPK-aktivierte Protein-kinase 2, die wiederum die Glykogensynthetase, das *cAMP responsive binding element* (CREB), das *heat shock protein* HSP27 und mehrere Transkriptionsfaktoren phosphoryliert [200]. Negativ reguliert wird p38 von Tyrosin-Phosphatasen, der PP2C und ausschließlich in Säugetierzellen, von dual spezifischen Proteinphosphatasen, die sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin dephosphorylieren können. Bislang sind vier Isoformen von p38 bekannt, von denen p38 α und β im Herzen vorrangig exprimiert werden [226]. Hierbei induziert die p38 α -Aktivierung den Zelltod, während p38 β für Zellhypertrophie und das Überleben steht [241]. Pharmakologisch erfolgt eine Aktivierung von p38 in KMNR durch Phenylephrin und PKC-abhängig durch Endothelin-1 [50].

Da der verwendete Antikörper nicht zwischen der „guten“ β - und der „schlechten“ α -Isoform differenzierte, kann keine klare Aussage über die Folgen bzw. Ursachen der hier beobachteten Hyperphosphorylierung von p38 in PPI-1-überexprimierenden KMNR gemacht werden. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der von Pathak et al. gefundenen Normalisierung einer p38-Hyperphosphorylierung in herzinsuffizienten Mäusen nach adenoviralem Gentransfer von PPI-1_(T35D,1-65). Allerdings wurde auch in dieser Arbeit nicht zwischen den beiden kardialen Isoformen differenziert [185].

4.5.2.3 Auswirkungen auf den cAMP-Gehalt

Bei der Stimulation der β -adrenergen Sinalkaskade in Kardiomyozyten werden stimulierende GTP-bindende Proteine (G_s) angeregt die Adenylylcyclase (AC) zu aktivieren, die wiederum die Konversion von ATP in cAMP katalysiert, das die PKA aktiviert [19]. Inaktiviert wird cAMP durch Phosphodiesterasen [12]. Ähnlich wie Calcium ist auch cAMP ein ubiquitär vorkommender Signaltransduktionsvermittler und es wird postuliert, dass innerhalb einer Zelle verschiedenste cAMP-abhängige Signaltransduktionswege parallel, aber räumlich voneinander getrennt, ablaufen [222; 252]. Dies lässt sich einfach bewerkstelligen, wenn cAMP wie auch die PKA oder die PP1 einer Kompartimentierung in subzelluläre Räume oder wie der Ryanodinrezeptor der Bindung in einem Konglomerat aus mehreren Enzymen unterworfen wird [19]. Hierbei spielen auch die Phosphodiesterasen eine wichtige Rolle [166].

Da PPI-1 PKA-abhängig über β -adrenerge Stimulation aktiviert wird, untersuchten wir den cAMP-Gehalt als zentrale Schaltstelle dieses Signaltransduktionsweges. Hier zeigte sich in allen KMNR-Homogenaten nach Stimulation mit Isoprenalin oder Forskolin, einem

direkten Aktivator der Adenylylcyclase, die erwartete starke Erhöhung des cAMP-Gehaltes. In EGFP-überexprimierenden Zellen konnte unstimuliert und unter Isoprenalin eine Tendenz zu erhöhtem cAMP-Gehalt im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollzellen beobachtet werden (s. Abb. 3.35). In den AdEGFP/PPI-1 infizierten KMNR hingegen wurde unter Isoprenalinstimulation eine signifikante Verminderung von cAMP offenbar (s. Abb. 3.35).

Die Verminderung des cAMP-Gehaltes in PPI-1 überexprimierenden KMNR könnte die Folge einer negativen Rückkopplung bzw. Kompensation der β -adrenergen Signalkaskade sein. Im Weiteren müsste die Kopplung mit den β -Adrenozeptoren und deren Dichte überprüft werden, um die Ebene, auf der die negative Rückkopplung einsetzt, zu identifizieren.

4.5.3 Morphologie der Kardiomyozyten

Die Morphologie einer Zelle kann Aufschluß über einige intrazelluläre Vorgänge geben. So erfolgt bei Einleitung der Apoptose eine Schrumpfung und Kondensation der Zelle, die Kernmembran zerfällt und die DNA zerbricht in Fragmente [7]. Die Hypertrophie, die unter anderem der Herzinsuffizienz vorangeht [234], macht sich indes durch vergrößertes Zellvolumen bemerkbar.

Bei der Untersuchung der Morphologie der KMNR zeigte sich eine Verminderung der Zellfläche in EGFP-überexprimierenden KMNR, während die uninfizierten Kontrollen, β -Galactosidase oder nur PPI-1-überexprimierende Zellen etwa die gleiche Größe aufwiesen (s. Abb. 3.36 und 3.37).

Dies könnte eine Bestätigung der vermuteten zytotoxischen Effekte durch EGFP in EGFP-exprimierenden KMNR (vgl. Kap. 4.4.1 und 4.5.1) sein und für eine beginnende oder schon fortgeschrittene Apoptose sprechen. Diese Hypothese müsste durch die Untersuchung der Apoptoserate in den Zellen validiert werden.

4.6 Die β -adrenerge Signalkaskade mit Regulation und Funktion von PPI-1 als Modell

Unter Einbeziehung der in dieser Arbeit und aktuellen Publikationen gewonnenen Erkenntnisse über PPI-1 in das Schaubild aus Abb. 1.1 entsteht ein neues Modell der β -adrenergen Signalkaskade in Kardiomyozyten. PPI-1 spielt hierin die Rolle des Verstärkers der β -adrenergen Signalkaskade und stellt zugleich ein Bindeglied zwischen zwei der wichtigsten *second messenger* der Zelle - cAMP und Calcium - dar.

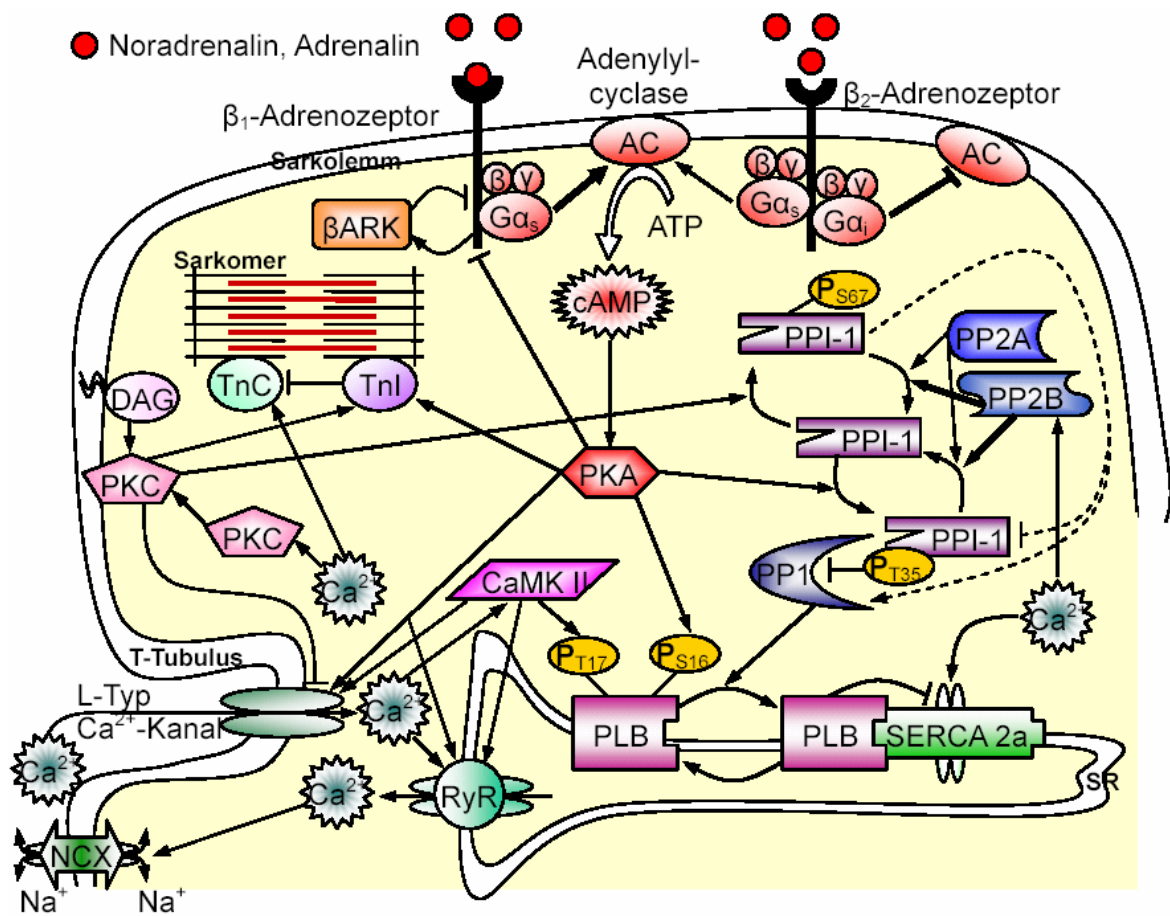


Abb. 4.1: β -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten.

Das Schaubild gibt einen Überblick über die β -adrenerge Signaltransduktion, die Rolle der Phosphatasen und des PPI-1, die elektromechanische Kopplung sowie die Rolle von Calcium bei diesen Prozessen, so wie es dem momentanen Stand der Forschung entspricht. Die gestrichelte Linie weist dabei auf kontrovers diskutierte Signalwege hin. β ARK entspricht der β -Adrenozeptorkinase; $G_{\alpha_{s/i}}$, α - Untereinheit des stimulierenden/inhibierenden G-Proteins; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase; PP1/2A/2B, Proteinphosphatase1/2A/2B; PPI-1, Proteinphosphatase Inhibitor-1; PLB, Phospholamban; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA 2a, SR-Calcium-ATPase; CaMK II, Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II; RyR, Ryanodin Rezeptor; PKC, Calciumabhängige Proteinkinase; DAG, Diacylglycerin; TnI/C, TroponinI/C; NCX Natrium-Calcium Austauscher; P, Phosphorylierung an der angegebenen Aminosäure. Übersichten dazu bei [54; 108; 199; 134; 195; 221; 19; 20; 160; 201; 153; 159; 208; 30; 73; 140; 238; 250]

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die funktionelle Anpassung der Herzleistung an den peripheren Bedarf wird im Wesentlichen durch den Sympathikus gewährleistet. Die sympathischen Transmitter Noradrenalin und Adrenalin (Katecholamine) aktivieren über β -Adrenozeptoren intrazelluläre Signalkaskaden, die über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zu Funktionsveränderungen von regulatorischen Phosphoproteinen führen und damit die verschiedenen physiologischen Effekte begründen. Der Phosphorylierungszustand wichtiger Phosphoproteine kann über eine Aktivierung der entsprechenden Kinase oder eine Hemmung der entsprechenden Phosphatase erhöht werden. Letztere werden vornehmlich durch inhibitorische Proteine reguliert. Der Proteinphosphatase Inhibitor-1 (PPI-1) ist ein solches Phosphatase-Regulatorprotein und hemmt ausschließlich nach Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) sehr potent die kardial vorherrschenden Typ 1 Proteinphosphatasen (PP1). PPI-1 ist aus Herzkreislauf-physiologischer Sicht besonders interessant, da über dieses Protein Katecholamine am Herzen nicht nur über die bekannte Aktivitätssteigerung der PKA, sondern auch durch eine Hemmung der PP1 wirken könnten. PPI-1 könnte so ein positives Rückkopplungselement der β -adrenergen Signalkaskade darstellen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren weder die prinzipielle Rolle noch die Auswirkungen einer veränderten Expression von PPI-1 im Herzen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Überexpression von PPI-1 in Herzmuskelzellen tatsächlich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Katecholaminen führt und ob dies mit einer gesteigerten Phosphorylierung von kardialen Regulatorproteinen einhergeht.

Methoden: Als Modelle dienten der adenoviraler Gentransfer von Wildtyp PPI-1 mit und ohne bicistronischer EGFP-Koexpression (AdEGFP/PPI-1 und AdPPI-1) in (1) Monolayerkulturen von Kardiomyozyten neonataler Ratten (KMNR) für die Untersuchung von biochemischen Parametern (radioaktive Phosphatase-Enzymassays mit und ohne rekombinantem PPI-1 Protein, cAMP-Immunoassays, Zellimmunfluoreszenzfärbungen und Western Blots mit phosphospezifischen Antikörpern) und/oder (2) rekonstituiertem Herzmuskelgewebe aus KMNR (*engineered heart tissue*, EHT) für die Untersuchung der Kontraktionsparameter (Kontraktionskraft, Kontraktionskinetik). Als Kontrollen dienten (1) nicht-infizierte, (2) „nur-EGFP“ (AdEGFP) und/oder (3) „nur LacZ“ (AdLacZ) überexprimierende KMNR bzw. EHTs. Während AdEGFP/PPI-1, AdEGFP und AdLacZ bereits generiert und hier nur vermehrt und aufgereinigt wurden, wurde AdPPI-1 im Rahmen dieser Arbeit neu generiert.

Ergebnisse: Zunächst wurde der adenovirale Gentransfer in EHTs mit Hilfe der EGFP-Epifluoreszenz und der konfokalen Lasermikroskopie erstmalig etabliert. Als optimale Bedingungen erwies sich die Infektion an Tag 10-12 nach Herstellung der EHTs mit einer Viruspartikelzahl/Zelle von 50-100 für 24-48 h. In diesem Modell wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

Die Virusinfektion und/oder die EGFP-Überexpression *per se* zeigten einen deutlichen kontraktilitätsmindernden Effekt (-33 bis -48%) im Vergleich zu nicht-infizierten EHTs.

PPI-1 überexprimierende EHTs (AdEGFP/PPI-1) zeigten eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem positiv inotropen Effekt von Isoprenalin (3,1-fach vs. uninfizierte Kontrollen und 1,5-fach vs. AdEGFP-infizierte EHTs).

In dem Modell der klassischen Monolayerkultur wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

PPI-1 überexprimierende KMNR zeigten eine erhöhte PKA-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban, einem zentralen Regulator des Calciumstoffwechsels in Herzmuskelzellen, an Serin¹⁶ verglichen mit uninfizierten (+15 bzw. +77%) und kontrollinfizierten (+3 bzw. +38%) KMNR.

Der cAMP-erhöhende Effekt von Isoprenalin war in PPI-1 überexprimierenden KMNR niedriger als in uninfizierten (-22%) und kontrollinfizierten (-26%) KMNR.

Schlussfolgerungen: Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass (1) EGFP-kodierende adenovirale Konstrukte *per se* die kontraktile Funktion in Herzmuskelzellen stark beeinträchtigen und (2) die Überexpression von PPI-1 zu einer Supersensitivität gegenüber Katecholaminen führt und dies eine vermehrte Phosphorylierung von Phospholamban einschließt. Die niedrigere cAMP-Konzentration nach PPI-1 Überexpression deutet auf kompensatorische Mechanismen oberhalb der PKA hin. Diese Daten stellen ein starkes Argument für die Hypothese dar, dass PPI-1 in der Tat ein positives Rückkopplungselement des β -adrenergen Signalwegs im Herzen darstellt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Für SI-Einheiten wurden die international gültigen Abkürzungen verwendet.

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat, Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat, Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Argingin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen:

^{14}C	radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AdEGFP	EGFP kodierender rekombinanter Adenovirus
AdEGFP-EHT	AdEGFP infiziertes EHT
AdEGFP-PPI-1	EGFP und PPI-1 kodierender rekombinanter Adenovirus
AdEGFP-PPI-1 _(-1-65, T35D)	trunkiertes, konstitutiv aktives PPI-1 kodierender rekombinanter Adenovirus

AdLacZ	β -Galactose kodierender rekombinanter Adenovirus
AdPPI-1	PPI-1 kodierender rekombinanter Adenovirus
AKAP	A-Kinase (PKA) ankernde Proteine
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AR	Adrenozeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BAV	biologisch aktive Viren
b	Basenpaare
β -ARK	β -Adrenozeptorkinase
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaMK	calcium-calmodulinabhängige Proteinkinase
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CBFHH	calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
Cdk	cyclinabhängige Kinase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
CREB	<i>cAMP responsive binding element</i>
CSQ	Calsequestrin
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dephospho-PPI-1	unphosphoryliertes PPI-1
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
E 1-4	Early Genes 1-4 des Adenoviruses
EBSS	Earle's based salt solution

EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration (Plasmakonzentration/AUC, die benötigt wird um 50% des maximalen Effekts <i>in vivo</i> zu erreichen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced</i> (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EHT	<i>engineered heart tissue</i> , rekonstituiertes Herzgewebe
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FKS	fetales Kälberserum
G _{αq}	PLC-stimulierendes G-Protein
G _i	inhibitorisches G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
g (bei der Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G _M	lokalisierende Untereinheit, die PP1 im Sarkoplasmatischen Retikulum an die transmembranäre Domäne von Phospholamban, in der quergestreiften Muskulatur an Glykogen bindet
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEK 293	E1 transformierte menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	InhibitorKonzentration, die benötigt wird, um eine 50%ige Minderung der Reaktionsrate hervorzurufen.
Iso	Isoprenalin
JNK	c-jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
K _{Ca}	Calciumstrom
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _K	Kaliumstrom

K_m	Substratzentration, die benötigt wird 50% der maximalen Aktivierung zu erreichen (Michaeliskonstante).
KM	Kardiomyozyt
KMNR	Kardiomyozyt neugeborener Ratten
KMNR	Kardiomyozyten neugeborener Ratten
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LB	Luria Broth
LSM	Laser Scanning Mikroskop, Axiovert Zeiss
LTD	Langzeitdepression
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>Multi Cloning Site</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MEK	= MAPKK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MEK2E	Erk aktivierende MEK
MG	Molekulargewicht
μCi	Mikro-Curie
min	Minute
mN	milli-Newton
MOI	Multiplizität der Infektion, Infektionsstärke
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MyBP-C	Myosin-bindendes Protein C
n	Anzahl der Proben
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NKM	Nichtkardiomyozytenmedium
ns.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p38	mitogen und Stress aktivierte Kinase p38
pAdEasy-1	Adenoviraler Karrier mit ringförmiger DNA (Plasmid) und Deletion der adenoviralen Gene E1 und E3 (Ad5dE13)
pAdTrack-CMV	Vektorplasmid mit doppelter Expressionskassette (eine <i>Multi Cloning Site</i> und eine mit EGFP)
pfu	<i>plaque forming units</i>

pIngo	Vektorplasmid mit einer Expressionskassette mit <i>Multi Cloning Site</i> , ohne EGFP
pSerin	phosphoryliertes Serin
pThreonin	phosphoryliertes Threonin
P/S	Penicillin und Streptomycin
PA	Polyadenylierungssequenz
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
Phospho-PLB-Serin ¹⁶	an Serin ¹⁶ phosphoryliertes PLB
Phospho-PLB-Threonin ¹⁷	an Threonin ¹⁷ phosphoryliertes PLB
Phospho-Thr ³⁵ -PPI-1	an Threonin ³⁵ phosphoryliertes PPI-1
PP	Proteinphosphatase
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	spontan aktive Proteinphosphatase 2A
PP2B	calciumabhängige Proteinphosphatase 2B
PP2C	magnesiumabhängige Proteinphosphatase 2C
PPI-1	Proteinphosphatase Inhibitor-1
PPI-1 _(T35D)	PPI-1, bei dem Threonin ³⁵ durch Aspartat ersetzt ist, wodurch es auch ohne Phosphorylierung aktiv ist
PPI-1 _(T35A)	nicht phosphorylierbares und dadurch nicht aktivierbares PPI-1, bei dem Threonin ³⁵ durch Alanin ersetzt ist
PPI-1 _(-1-65, T35D)	trunkiertes (Aminosäuren -1-65), konstitutiv aktives PPI-1, welches auch unphosphoryliert aktiv ist (T35D)
PS16	Antikörper gegen Phosphoserin ¹⁶ von Phospholamban
pSKAC	Vektor
pT ³⁵ -PPI-1	an Threonin ³⁵ phosphoryliertes PPI-1
PT17	Antikörper gegen Phosphothreonin ¹⁷ von Phospholamban
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription

RT-PCR	PCR mit reverser Transkriptase zur Umschreibung von RNA in cDNA
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA 2A	kardiale Isoform der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SOC	Superoptimal Broth Medium, reichhaltiges Wachstumsmedium für Bakterien
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
Tn	Troponin
Tn C	Troponon C
Tn I	Troponin I
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
Vektor	DNA-Molekül, das in einem Wirtsorganismus zur Replikation in der Lage ist und aus dem man durch den Einbau eines fremden Gens ein rekombinantes DNA-Molekül konstruieren kann
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
VS	<i>Virus Storage Buffer</i> , Virusaufbewahrungspuffer
VPS	Viruspartikel pro Zelle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid, Lactoseanalogon
Δ	Veränderung
α/β -MHC	adulte und fetale Isoform der schweren Kette von Myosin
\emptyset	Durchmesser

7 Literaturverzeichnis

- [1] K. F. Adams, Jr. New epidemiologic perspectives concerning mild-to-moderate heart failure. *Am J Med* 2001; 110 Suppl 7A:6S-13S.
- [2] J. B. Aggen, A. C. Nairn and R. Chamberlin. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 2000; 7:R13-23.
- [3] Z. Ahmad, F. J. Green, H. S. Subuhi and A. M. Watanabe. Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* 1989; 264:3859-63.
- [4] A. Aitken, T. Bilham and P. Cohen. Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1982; 126:235-46.
- [5] A. Aitken and P. Cohen. Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1982; 147:54-8.
- [6] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. The Shape and Structure of Proteins, Chapter 3. Garland Science, Taylor&Francis Group 2002 4th; 133.
- [7] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. Programmed Cell Death (Apoptosis), Chapter 17. Garland Science, Taylor&Francis Group 2002 1010-1014.
- [8] R. Alder and H. Barbas. Complementary distribution of the phosphoproteins DARPP-32 and I-1 in the cerebellar system. *Neuroreport* 1995; 6:2368-72.
- [9] D. Barford, A. K. Das and M. P. Egloff. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998; 27:133-64.
- [10] H. M. Barker, N. D. Brewis, A. J. Street, N. K. Spurr and P. T. Cohen. Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta* 1994; 1220:212-8.
- [11] S. Bartel, D. Vetter, W. P. Schlegel, G. Wallukat, E. G. Krause and P. Karczewski. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 in the absence and presence of beta-adrenergic stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:2173-85.
- [12] J. A. Beavo and L. L. Brunton. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:710-8.
- [13] N. F. Bence, R. M. Sampat and R. R. Kopito. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001; 292:1552-5.
- [14] E. J. Bennett, N. F. Bence, R. Jayakumar and R. R. Kopito. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 2005; 17:351-65.
- [15] I. Berrebi-Bertrand, N. Brument-Larignon, J. C. Camelin, M. J. Quiniou and A. Bril. Relationship between biochemical and functional effects of protein phosphatase 1 inhibitors in rabbit cardiac skinned fibers. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1945-54.
- [16] I. Berrebi-Bertrand, M. Souchet, J. C. Camelin, M. P. Laville, T. Calmels and A. Bril. Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM. *FEBS Lett* 1998; 439:224-30.
- [17] M. J. Berridge, M. D. Bootman and P. Lipp. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998; 395:645-8.
- [18] M. J. Berridge, M. D. Bootman and H. L. Roderick. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:517-29.
- [19] D. M. Bers and M. T. Ziolo. When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization. *Circ Res* 2001; 89:373-5.
- [20] D. M. Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415:198-205.

- [21] D. M. Bers. Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ Res* 2002; 90:14-7.
- [22] D. M. Bers. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:417-29.
- [23] J. A. Bibb, G. L. Snyder, A. Nishi, Z. Yan, L. Meijer, A. A. Fienberg, L. H. Tsai, Y. T. Kwon, J. A. Girault, A. J. Czernik, R. L. Huganir, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 1999; 402:669-71.
- [24] J. A. Bibb, A. Nishi, J. P. O'Callaghan, J. Ule, M. Lan, G. L. Snyder, A. Horiuchi, T. Saito, S. Hisanaga, A. J. Czernik, A. C. Nairn and P. Greengard. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by Cdk5. *J Biol Chem* 2001; 276:14490-7.
- [25] B. Biosciences. pEGFP-C1 Vector Information. Becton, Dickinson and Company 2002.
- [26] N. Blom, S. Gammeltoft and S. Brunak. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294:1351-62.
- [27] P. Boknik, M. Fockenbrock, S. Herzig, J. Knapp, B. Linck, H. Luss, F. U. Muller, T. Muller, W. Schmitz, F. Schroder and J. Neumann. Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362:222-31.
- [28] M. Bollen and W. Stalmans. The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; 27:227-81.
- [29] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- [30] J. C. Braz, K. Gregory, A. Pathak, W. Zhao, B. Sahin, R. Kleivitsky, T. F. Kimball, J. N. Lorenz, A. C. Nairn, S. B. Liggett, I. Bodi, S. Wang, A. Schwartz, E. G. Lakatta, A. A. DePaoli-Roach, J. Robbins, T. E. Hewett, J. A. Bibb, M. V. Westfall, E. G. Kranias and J. D. Molkenstein. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med* 2004; 10:248-54.
- [31] S. Brene, N. Lindfors, M. Ehrlich, T. Taubes, A. Horiuchi, J. Kopp, H. Hall, G. Sedvall, P. Greengard and H. Persson. Expression of mRNAs encoding ARPP-16/19, ARPP-21, and DARPP-32 in human brain tissue. *J Neurosci* 1994; 14:985-98.
- [32] M. R. Bristow, R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison and E. B. Stinson. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307:205-11.
- [33] M. R. Bristow, R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson and et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 1986; 59:297-309.
- [34] M. R. Bristow, W. A. Minobe, M. V. Reynolds, J. D. Port, R. Rasmussen, P. E. Ray and A. M. Feldman. Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* 1993; 92:2737-45.
- [35] A. G. Brittsan and E. G. Kranias. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:2131-9.
- [36] O. E. Brodde. The functional importance of beta 1 and beta 2 adrenoceptors in the human heart. *Am J Cardiol* 1988; 62:24C-29C.
- [37] T. A. Brown. Zucht und Ernte einer Bakterienkultur. *Spektrum Akademischer Verlag* 1999 2nd; 43-44.

- [38] S. Bundesamt. Statistisches Bundesamt 2004.
- [39] D. Carling and D. G. Hardie. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1012:81-6.
- [40] A. N. Carr, R. L. Sutliff, C. S. Weber, P. B. Allen, P. Greengard, P. de Lanerolle, E. G. Kranias and R. J. Paul. Is myosin phosphatase regulated in vivo by inhibitor-1? Evidence from inhibitor-1 knockout mice. *J Physiol* 2001; 534:357-66.
- [41] A. N. Carr, A. G. Schmidt, Y. Suzuki, F. del Monte, Y. Sato, C. Lanner, K. Breeden, S. L. Jing, P. B. Allen, P. Greengard, A. Yatani, B. D. Hoit, I. L. Grupp, R. J. Hajjar, A. A. DePaoli-Roach and E. G. Kranias. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 2002; 22:4124-35.
- [42] H. Ceulemans, W. Stalmans and M. Bollen. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 2002; 24:371-81.
- [43] H. Ceulemans and M. Bollen. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 2004; 84:1-39.
- [44] M. X. Chen, Y. H. Chen and P. T. Cohen. Polymerase chain reactions using *Saccharomyces*, *Drosophila* and human DNA predict a large family of protein serine/threonine phosphatases. *FEBS Lett* 1992; 306:54-8.
- [45] D. J. Choi, W. J. Koch, J. J. Hunter and H. A. Rockman. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:17223-9.
- [46] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.
- [47] G. Chu, L. Li, Y. Sato, J. M. Harrer, V. J. Kadambi, B. D. Hoit, D. M. Bers and E. G. Kranias. Pentameric assembly of phospholamban facilitates inhibition of cardiac function in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273:33674-80.
- [48] G. Chu, J. W. Lester, K. B. Young, W. Luo, J. Zhai and E. G. Kranias. A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta-agonists. *J Biol Chem* 2000; 275:38938-43.
- [49] A. Ciechanover and P. Brundin. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 2003; 40:427-46.
- [50] A. Clerk, A. Michael and P. H. Sugden. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 1998; 142:523-35.
- [51] P. Cohen, D. B. Rylatt and G. A. Nimmo. The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1. *FEBS Lett* 1977; 76:182-6.
- [52] P. Cohen, G. A. Nimmo, S. Shenolikar and J. G. Foulkes. 1979 161-169.
- [53] P. Cohen, J. G. Foulkes, C. F. Holmes, G. A. Nimmo and N. K. Tonks. Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* 1988; 159:427-37.
- [54] P. Cohen. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:453-508.
- [55] P. T. Cohen. Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett* 1988; 232:17-23.
- [56] P. T. Cohen. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:245-51.

- [57] P. T. Cohen. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 2002; 115:241-56.
- [58] P. T. W. Cohen. Molecular biology of protein serine/threonine phosphatases regulating metabolism. *John Libbey* 1990 27-40.
- [59] J. N. Cohn, T. B. Levine, M. T. Olivari, V. Garberg, D. Lura, G. S. Francis, A. B. Simon and T. Rector. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311:819-23.
- [60] J. Colyer. Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 853:79-91.
- [61] J. H. Connor, H. N. Quan, N. T. Ramaswamy, L. Zhang, S. Barik, J. Zheng, J. F. Cannon, E. Y. Lee and S. Shenolikar. Inhibitor-1 interaction domain that mediates the inhibition of protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 1998; 273:27716-24.
- [62] J. H. Connor, T. Kleeman, S. Barik, R. E. Honkanen and S. Shenolikar. Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem* 1999; 274:22366-72.
- [63] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross and R. Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:448-55.
- [64] R. Dash, K. F. Frank, A. N. Carr, C. S. Moravec and E. G. Kranias. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1345-53.
- [65] F. del Monte, S. E. Harding, U. Schmidt, T. Matsui, Z. B. Kang, G. W. Dec, J. K. Gwathmey, A. Rosenzweig and R. J. Hajjar. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999; 100:2308-11.
- [66] F. del Monte, R. J. Hajjar and S. E. Harding. Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. *Circ Res* 2001; 88:E66-7.
- [67] A. A. DePaoli-Roach. Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem* 1984; 259:12144-52.
- [68] F. Desdouits, J. J. Cheetham, H. B. Huang, Y. G. Kwon, E. F. da Cruz e Silva, P. Deneffe, M. E. Ehrlich, A. C. Nairn, P. Greengard and J. A. Girault. Mechanism of inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32: studies with recombinant DARPP-32 and synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206:652-8.
- [69] F. Desdouits, D. Cohen, A. C. Nairn, P. Greengard and J. A. Girault. Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995; 270:8772-8.
- [70] F. Desdouits, J. C. Siciliano, P. Greengard and J. A. Girault. Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2682-5.
- [71] F. Desdouits, J. C. Siciliano, A. C. Nairn, P. Greengard and J. A. Girault. Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem J* 1998; 330 (Pt 1):211-6.
- [72] V. Dombardi, J. M. Axton, N. D. Brewis, E. F. da Cruz e Silva, L. Alpey and P. T. Cohen. Drosophila contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem* 1990; 194:739-45.
- [73] G. W. Dorn, 2nd and J. D. Molkentin. Manipulating cardiac contractility in heart failure: data from mice and men. *Circulation* 2004; 109:150-8.

- [74] G. A. Drago and J. Colyer. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem* 1994; 269:25073-7.
- [75] M. H. Drazner, K. C. Peppel, S. Dyer, A. O. Grant, W. J. Koch and R. J. Lefkowitz. Potentiation of beta-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997; 99:288-96.
- [76] V. Dumasius, M. Jameel, J. Burhop, F. J. Meng, L. C. Welch, G. G. Mutlu and P. Factor. In vivo timing of onset of transgene expression following adenoviral-mediated gene transfer. *Virology* 2003; 308:243-9.
- [77] T. Durfee, K. Becherer, P. L. Chen, S. H. Yeh, Y. Yang, A. E. Kilburn, W. H. Lee and S. J. Elledge. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993; 7:555-69.
- [78] M. P. Egloff, P. T. Cohen, P. Reinemer and D. Barford. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 1995; 254:942-59.
- [79] M. P. Egloff, D. F. Johnson, G. Moorhead, P. T. Cohen, P. Cohen and D. Barford. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 1997; 16:1876-87.
- [80] A. El-Armouche, T. Pamminger, D. Ditz, O. Zolk and T. Eschenhagen. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 2004; 61:87-93.
- [81] A. El-Armouche, A. Bednorz, T. Pamminger, D. Ditz, M. Didie, D. Dobrev and T. Eschenhagen. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:700-6.
- [82] A. Elbrecht, J. DiRenzo, R. G. Smith and S. Shenolikar. Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues. *J Biol Chem* 1990; 265:13415-8.
- [83] S. Endo, X. Zhou, J. Connor, B. Wang and S. Shenolikar. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 1996; 35:5220-8.
- [84] S. Endo, J. H. Connor, B. Forney, L. Zhang, T. S. Ingebritsen, E. Y. Lee and S. Shenolikar. Conversion of protein phosphatase 1 catalytic subunit to a Mn(2+)-dependent enzyme impairs its regulation by inhibitor 1. *Biochemistry* 1997; 36:6986-92.
- [85] T. Eschenhagen, U. Mende, M. Nose, W. Schmitz, H. Scholz, A. Haverich, S. Hirt, V. Doring, P. Kalmar, W. Hoppner and et al. Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure. *Circ Res* 1992; 70:688-96.
- [86] T. Eschenhagen, U. Mende, W. Schmitz and H. Scholz. [Changes in gene expression in terminal myocardial failure]. *Z Kardiol* 1992; 81 Suppl 4:33-40.
- [87] T. W. Eschenhagen, J. Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz. Ganten, D.; Ruckpaul, K. 1998 147-221.
- [88] A. M. Feldman, A. E. Cates, W. B. Veazey, R. E. Hershberger, M. R. Bristow, K. L. Baughman, W. A. Baumgartner and C. Van Dop. Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 1988; 82:189-97.
- [89] J. R. Feramisco, D. B. Glass and E. G. Krebs. Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1980; 255:4240-5.

- [90] M. S. Feschenko, E. Stevenson, A. C. Nairn and K. J. Sweadner. A novel cAMP-stimulated pathway in protein phosphatase 2A activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:111-8.
- [91] J. G. Foulkes and P. Cohen. The hormonal control of glycogen metabolism. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to adrenaline. *Eur J Biochem* 1979; 97:251-6.
- [92] J. G. Foulkes, L. S. Jefferson and P. Cohen. The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin. *FEBS Lett* 1980; 112:21-4.
- [93] G. S. Francis and W. H. Tang. Pathophysiology of congestive heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4 Suppl 2:S14-20.
- [94] K. F. Frank, B. Bolck, K. Brixius, E. G. Kranias and R. H. Schwinger. Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 2002; 97 Suppl 1:I72-8.
- [95] K. Freeman, I. Lerman, E. G. Kranias, T. Bohlmeier, M. R. Bristow, R. J. Lefkowitz, G. Iaccarino, W. J. Koch and L. A. Leinwand. Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001; 107:967-74.
- [96] A. Gambotto, G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz, T. Tuting, P. D. Robbins and A. B. DeLeo. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 2000; 7:2036-40.
- [97] U. Gergs, P. Boknik, I. Buchwalow, L. Fabritz, M. Matus, I. Justus, G. Hanske, W. Schmitz and J. Neumann. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 2004; 279:40827-34.
- [98] J. A. Girault, H. C. Hemmings, Jr., K. R. Williams, A. C. Nairn and P. Greengard. Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *J Biol Chem* 1989; 264:21748-59.
- [99] A. L. Goldberg. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003; 426:895-9.
- [100] J. Goldberg, H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn and J. Kuriyan. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 1995; 376:745-53.
- [101] I. Gombosova, P. Boknik, U. Kirchhefer, J. Knapp, H. Luss, F. U. Muller, T. Muller, U. Vahlensieck, W. Schmitz, G. S. Bodor and J. Neumann. Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol* 1998; 274:H2123-32.
- [102] P. Greengard, P. B. Allen and A. C. Nairn. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 1999; 23:435-47.
- [103] R. C. Gupta, J. Neumann, A. M. Watanabe, M. Lesch and H. N. Sabbah. Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte. *Am J Physiol* 1996; 270:H1159-64.
- [104] R. C. Gupta, J. Neumann, A. M. Watanabe and H. N. Sabbah. Inhibition of type 1 protein phosphatase activity by activation of beta-adrenoceptors in ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:1069-76.
- [105] R. C. Gupta, S. Mishra, S. Rastogi, M. Imai, O. Habib and H. N. Sabbah. Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H2373-81.

- [106] E. L. Gustafson, J. A. Girault, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard. Immunocytochemical localization of phosphatase inhibitor-1 in rat brain. *J Comp Neurol* 1991; 310:170-88.
- [107] K. Haghghi, F. Kolokathis, L. Pater, R. A. Lynch, M. Asahi, A. O. Gramolini, G. C. Fan, D. Tsiapras, H. S. Hahn, S. Adamopoulos, S. B. Liggett, G. W. Dorn, 2nd, D. H. MacLennan, D. T. Kremastinos and E. G. Kranias. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 2003; 111:869-76.
- [108] R. J. Hajjar, F. U. Muller, W. Schmitz, P. Schnabel and M. Bohm. Molecular aspects of adrenergic signal transduction in cardiac failure. *J Mol Med* 1998; 76:747-55.
- [109] G. Hasenfuss, H. Reinecke, R. Studer, B. Pieske, M. Meyer, H. Drexler and H. Just. Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol* 1996; 91 Suppl 2:17-22.
- [110] G. Hasenfuss and B. Pieske. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:951-69.
- [111] G. J. Hasking, M. D. Esler, G. L. Jennings, D. Burton, J. A. Johns and P. I. Korner. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 1986; 73:615-21.
- [112] T. C. He, S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:2509-14.
- [113] L. Helmuth. Cell biology. Protein clumps hijack cell's clearance system. *Science* 2001; 292:1467-8.
- [114] H. C. Hemmings, Jr., J. A. Girault, A. C. Nairn, G. Bertuzzi and P. Greengard. Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *J Neurochem* 1992; 59:1053-61.
- [115] A. Hershko and A. Ciechanover. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425-79.
- [116] A. Hershko, A. Ciechanover and A. Varshavsky. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 2000; 6:1073-81.
- [117] S. Herzig and J. Neumann. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 2000; 80:173-210.
- [118] A. Hiraga and P. Cohen. Phosphorylation of the glycogen-binding subunit of protein phosphatase-1G by cyclic-AMP-dependent protein kinase promotes translocation of the phosphatase from glycogen to cytosol in rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1986; 161:763-9.
- [119] K. K. Ho, K. M. Anderson, W. B. Kannel, W. Grossman and D. Levy. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993; 88:107-15.
- [120] K. K. Ho, J. L. Pinsky, W. B. Kannel and D. Levy. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:6A-13A.
- [121] C. I. Holmberg, K. E. Staniszewski, K. N. Mensah, A. Matouschek and R. I. Morimoto. Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *Embo J* 2004; 23:4307-18.
- [122] M. Hoshijima, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, S. Minamisawa, M. O. Date, Y. Gu, M. Iwatate, M. Li, L. Wang, J. M. Wilson, Y. Wang, J. Ross, Jr. and K. R. Chien. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* 2002; 8:864-71.

- [123] F. L. Huang and W. H. Glinsmann. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1976; 70:419-26.
- [124] H. B. Huang, A. Horiuchi, T. Watanabe, S. R. Shih, H. J. Tsay, H. C. Li, P. Greengard and A. C. Nairn. Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 1999; 274:7870-8.
- [125] K. X. Huang and H. K. Paudel. Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5824-9.
- [126] W. Y. Huang, J. Aramburu, P. S. Douglas and S. Izumo. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2000; 6:482-3.
- [127] M. J. Hubbard and P. Cohen. Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem* 1989; 186:711-6.
- [128] M. J. Hubbard and P. Cohen. Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 1. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase at site 2 releases catalytic subunit from the glycogen-bound holoenzyme. *Eur J Biochem* 1989; 186:701-9.
- [129] M. J. Hubbard and P. Cohen. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 1993; 18:172-7.
- [130] T. Hunter. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80:225-36.
- [131] G. Iaccarino, E. D. Tomhave, R. J. Lefkowitz and W. J. Koch. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 1998; 98:1783-9.
- [132] T. S. Ingebritsen and P. Cohen. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 1983; 221:331-8.
- [133] R. B. Iyer, S. B. Koritz and M. A. Kirchberger. A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 55:1-6.
- [134] T. Jalili, Y. Takeishi and R. A. Walsh. Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC. *Cardiovasc Res* 1999; 44:5-9.
- [135] V. Jesenberger and S. Jentsch. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:112-21.
- [136] V. J. Kadambi and E. G. Kranias. Phospholamban: a protein coming of age. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239:1-5.
- [137] D. L. Kasper, E. Braunwald, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo and J. L. Jameson. *Heart Failure*, Chapter 216. McGraw-Hill Professional 2004 16th;
- [138] A. Kass-Eisler, E. Falck-Pedersen, M. Alvira, J. Rivera, P. M. Buttrick, B. A. Wittenberg, L. Cipriani and L. A. Leinwand. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:11498-502.
- [139] P. J. Kennelly and E. G. Krebs. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 1991; 266:15555-8.
- [140] J. R. Keys and W. J. Koch. The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:13-30.
- [141] B. S. Khatra, J. L. Chiasson, H. Shikama, J. H. Exton and T. R. Soderling. Effect of epinephrine and insulin on the phosphorylation of phosphorylase phosphatase inhibitor 1 in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1980; 114:253-6.
- [142] K. Kinsella and V. A. Velkoff. *An Aging world: 2001*. U.S. Census Bureau 2001.

- [143] U. Kirchhefer, P. Boknik, W. Schmitz and J. Neumann. Generation of mice that overexpress protein phosphatase inhibitor-2 in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363:R98.
- [144] L. A. Kirshenbaum. Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 1997; 172:13-21.
- [145] E. G. Kranias and J. Di Salvo. A phospholamban protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1986; 261:10029-32.
- [146] H. E. Krestel, A. L. Mihaljevic, D. A. Hoffman and A. Schneider. Neuronal co-expression of EGFP and beta-galactosidase in mice causes neuropathology and premature death. *Neurobiol Dis* 2004; 17:310-8.
- [147] R. Kumar and R. W. Joyner. Expression of protein phosphatases during postnatal development of rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 2003; 245:91-8.
- [148] Y. G. Kwon, H. B. Huang, F. Desdouits, J. A. Girault, P. Greengard and A. C. Nairn. Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3536-41.
- [149] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
- [150] S. E. Lehnart, W. Schillinger, B. Pieske, J. Prestle, H. Just and G. Hasenfuss. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 853:220-30.
- [151] P. Liao, S. Q. Wang, S. Wang, M. Zheng, S. J. Zhang, H. Cheng, Y. Wang and R. P. Xiao. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circ Res* 2002; 90:190-6.
- [152] H. S. Liu, M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen and N. J. Ke. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260:712-7.
- [153] M. J. Lohse, S. Engelhardt and T. Eschenhagen. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003; 93:896-906.
- [154] P. R. Lowenstein, A. F. Shering, L. K. MacDougall and P. Cohen. Immunolocalisation of protein phosphatase inhibitor-1 in the cerebral cortex of the rat, cat and ferret. *Brain Res* 1995; 676:80-92.
- [155] W. Luo, I. L. Grupp, J. Harrer, S. Ponniah, G. Grupp, J. J. Duffy, T. Doetschman and E. G. Kranias. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994; 75:401-9.
- [156] W. Luo, B. M. Wolska, I. L. Grupp, J. M. Harrer, K. Haghighi, D. G. Ferguson, J. P. Slack, G. Grupp, T. Doetschman, R. J. Solaro and E. G. Kranias. Phospholamban gene dosage effects in the mammalian heart. *Circ Res* 1996; 78:839-47.
- [157] L. K. MacDougall, D. G. Campbell, M. J. Hubbard and P. Cohen. Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1010:218-26.
- [158] L. K. MacDougall, L. R. Jones and P. Cohen. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 1991; 196:725-34.
- [159] D. H. MacLennan and E. G. Kranias. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:566-77.
- [160] L. S. Maier and D. M. Bers. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:919-39.
- [161] A. R. Marks, S. O. Marx and S. Reiken. Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:166-70.

- [162] E. J. Mayer, W. Huckle, R. G. Johnson, Jr. and E. McKenna. Characterization and quantitation of phospholamban and its phosphorylation state using antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:40-8.
- [163] M. Meyer, W. Schillinger, B. Pieske, C. Holubarsch, C. Heilmann, H. Posival, G. Kuwajima, K. Mikoshiba, H. Just, G. Hasenfuss and et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92:778-84.
- [164] S. Minamisawa, M. Hoshijima, G. Chu, C. A. Ward, K. Frank, Y. Gu, M. E. Martone, Y. Wang, J. Ross, Jr., E. G. Kranias, W. R. Giles and K. R. Chien. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 1999; 99:313-22.
- [165] S. Mishra, R. C. Gupta, N. Tiwari, V. G. Sharov and H. N. Sabbah. Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21:366-73.
- [166] M. Mongillo, T. McSorley, S. Evellin, A. Sood, V. Lissandron, A. Terrin, E. Huston, A. Hannawacker, M. J. Lohse, T. Pozzan, M. D. Houslay and M. Zaccolo. Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 2004; 95:67-75.
- [167] L. A. Mulieri, G. Hasenfuss, B. Leavitt, P. D. Allen and N. R. Alpert. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 1992; 85:1743-50.
- [168] R. M. Mulkey, S. Endo, S. Shenolikar and R. C. Malenka. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 1994; 369:486-8.
- [169] G. Münch, B. Bolck, K. Brixius, H. Reuter, U. Mehlhorn, W. Bloch and R. H. Schwinger. SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1924-32.
- [170] C. Mundina-Weilenmann, L. Vittone, M. Ortale, G. C. de Cingolani and A. Mattiazzi. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *J Biol Chem* 1996; 271:33561-7.
- [171] F. Münzel. Chronische Effekte und Signaltransduktionsmechanismen von Endothelin-1 in rekonstituiertem Herzgewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 2003 189.
- [172] N. F. Murphy, C. R. Simpson, F. A. McAlister, S. Stewart, K. MacIntyre, M. Kirkpatrick, J. Chalmers, A. Redpath, S. Capewell and J. J. McMurray. National survey of the prevalence, incidence, primary care burden, and treatment of heart failure in Scotland. *Heart* 2004; 90:1129-36.
- [173] A. C. Nairn. Answer PPI-1 amino acid exchange. 2003
- [174] NetPhosK. NetPhosK 2.0. Center for Biological Sequenceanalysis, Technical University of Denmark 2.0;
- [175] J. Neumann, R. C. Gupta, W. Schmitz, H. Scholz, A. C. Nairn and A. M. Watanabe. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 1991; 69:1450-7.
- [176] J. Neumann, T. Eschenhagen, L. R. Jones, B. Linck, W. Schmitz, H. Scholz and N. Zimmermann. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:265-72.
- [177] C. Nguyen, A. Nishi, J. W. Kansy, J. Fernandez, K. Hayashi, F. Gillardon, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and J. A. Bibb. Regulation of protein phosphatase inhibitor-1 by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem* 2007; 282:16511-20.

- [178] G. A. Nimmo and P. Cohen. The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1978; 87:341-51.
- [179] G. A. Nimmo and P. Cohen. The regulation of glycogen metabolism. Phosphorylation of inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle, and its interaction with protein phosphatases-III and -II. *Eur J Biochem* 1978; 87:353-65.
- [180] J. Novotny, B. Gustafson, P. Kvapil and L. A. Ransnas. Adenovirus infection of myocardial cells induces an enhanced sensitivity to beta-adrenergic agonists by increasing the concentration of the stimulatory G-protein. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 34:993-1001.
- [181] J. M. O'Donnell, C. M. Sumbilla, H. Ma, I. K. Farrance, M. Cavagna, M. G. Klein and G. Inesi. Tight control of exogenous SERCA expression is required to obtain acceleration of calcium transients with minimal cytotoxic effects in cardiac myocytes. *Circ Res* 2001; 88:415-21.
- [182] C. J. Oliver and S. Shenolikar. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* 1998; 3:D961-72.
- [183] L. H. Opie. Regulation of myocardial contractility. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26 Suppl 1:S1-9.
- [184] S. Orrenius, B. Zhivotovsky and P. Nicotera. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:552-65.
- [185] A. Pathak, F. Del Monte, W. Zhao, J. E. Schultz, J. N. Lorenz, I. Bodi, D. Weiser, H. Hahn, A. Carr, F. Syed, N. Mavila, L. Jha, J. Qian, Y. Marreez, G. Chen, D. W. McGraw, E. K. Heist, J. L. Guerrero, A. A. Depaoli-Roach, R. J. Hajjar and E. G. Kranias. Enhancement of Cardiac Function and Suppression of Heart Failure Progression By Inhibition of Protein Phosphatase 1. *Circ Res* 2005;
- [186] R. B. Pearson and B. E. Kemp. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991; 200:62-81.
- [187] T. A. Pearson. Cardiovascular disease in developing countries: myths, realities, and opportunities. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13:95-104.
- [188] V. Piacentino, 3rd, C. R. Weber, X. Chen, J. Weisser-Thomas, K. B. Margulies, D. M. Bers and S. R. Houser. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 2003; 92:651-8.
- [189] B. Pieske, B. Kretschmann, M. Meyer, C. Holubarsch, J. Weirich, H. Posival, K. Minami, H. Just and G. Hasenfuss. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995; 92:1169-78.
- [190] B. Pieske, L. S. Maier, D. M. Bers and G. Hasenfuss. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999; 85:38-46.
- [191] B. Pieske, L. S. Maier and S. Schmidt-Schweda. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ load in human heart failure. *Basic Res Cardiol* 2002; 97 Suppl 1:163-71.
- [192] J. A. Pitcher, N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:653-92.
- [193] S. M. Pogwizd and D. M. Bers. Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002; 13:88-91.
- [194] J. D. Port and M. R. Bristow. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:887-905.
- [195] S. R. Post, H. K. Hammond and P. A. Insel. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:343-60.
- [196] PubMed. Suche nach der Nucleotide Accession number.

- [197] PubMed. Suche nach der Protein Accession number.
- [198] L. A. Ransnas. The role of G-proteins in transduction of the beta-adrenergic response in heart failure. *Heart Vessels Suppl* 1991; 6:3-5.
- [199] S. T. Rapundalo. Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 1998; 38:559-88.
- [200] T. Ravingerova, M. Barancik and M. Strniskova. Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem* 2003; 247:127-38.
- [201] H. A. Rockman, W. J. Koch and R. J. Lefkowitz. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002; 415:206-12.
- [202] P. P. Roux and J. Blenis. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:320-44.
- [203] M. L. Ruehr, M. A. Russell and M. Bond. A-kinase anchoring protein targeting of protein kinase A in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:653-65.
- [204] B. Rundqvist, M. Elam, Y. Bergmann-Sverrisdottir, G. Eisenhofer and P. Friberg. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* 1997; 95:169-75.
- [205] M. Said, C. Mundina-Weilenmann, L. Vittoni and A. Mattiazzi. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch* 2002; 444:801-9.
- [206] K. Sasaki, H. Shima, Y. Kitagawa, S. Irino, T. Sugimura and M. Nagao. Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:1272-80.
- [207] Y. Sato, H. Kiriazis, A. Yatani, A. G. Schmidt, H. Hahn, D. G. Ferguson, H. Sako, S. Mitarai, R. Honda, L. Mesnard-Rouiller, K. F. Frank, B. Beyermann, G. Wu, K. Fujimori, G. W. Dorn, 2nd and E. G. Kranias. Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in caldesmon overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem* 2001; 276:9392-9.
- [208] J. J. Saucerman, L. L. Brunton, A. P. Michailova and A. D. McCulloch. Modeling beta-adrenergic control of cardiac myocyte contractility in silico. *J Biol Chem* 2003; 278:47997-8003.
- [209] U. Schmidt, R. J. Hajjar, C. S. Kim, D. Lebeche, A. A. Doye and J. K. Gwathmey. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am J Physiol* 1999; 277:H474-80.
- [210] H. D. Schmitz and J. Bereiter-Hahn. GFP associates with microfilaments in fixed cells. *Histochem Cell Biol* 2001; 116:89-94.
- [211] R. H. Schwinger, G. Munch, B. Bolck, P. Karczewski, E. G. Krause and E. Erdmann. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:479-91.
- [212] S. Shenolikar and A. C. Nairn. Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1991; 23:1-121.
- [213] S. Shenolikar. Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:55-86.
- [214] S. Shenolikar. Protein phosphatase regulation by endogenous inhibitors. *Semin Cancer Biol* 1995; 6:219-27.
- [215] H. K. Simmerman and L. R. Jones. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998; 78:921-47.
- [216] P. Simpson. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-

- adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res* 1985; 56:884-94.
- [217] J. P. Slack, I. L. Grupp, R. Dash, D. Holder, A. Schmidt, M. J. Gerst, T. Tamura, C. Tilgmann, P. F. James, R. Johnson, A. M. Gerdes and E. G. Kranias. The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1031-40.
- [218] G. L. Snyder, J. A. Girault, J. Y. Chen, A. J. Czernik, J. W. Keabian, J. A. Nathanson and P. Greengard. Phosphorylation of DARPP-32 and protein phosphatase inhibitor-1 in rat choroid plexus: regulation by factors other than dopamine. *J Neurosci* 1992; 12:3071-83.
- [219] Q. Song, A. G. Schmidt, H. S. Hahn, A. N. Carr, B. Frank, L. Pater, M. Gerst, K. Young, B. D. Hoit, B. K. McConnell, K. Haghghi, C. E. Seidman, J. G. Seidman, G. W. Dorn, 2nd and E. G. Kranias. Rescue of cardiomyocyte dysfunction by phospholamban ablation does not prevent ventricular failure in genetic hypertrophy. *J Clin Invest* 2003; 111:859-67.
- [220] N. A. Steenaart, J. R. Ganim, J. Di Salvo and E. G. Kranias. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1992; 293:17-24.
- [221] S. F. Steinberg. The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 1999; 85:1101-11.
- [222] S. F. Steinberg and L. L. Brunton. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:751-73.
- [223] A. A. Stewart, T. S. Ingebritsen and P. Cohen. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 5. Purification and properties of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1983; 132:289-95.
- [224] S. Stewart, K. MacIntyre, S. Capewell and J. J. McMurray. Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 2003; 89:49-53.
- [225] P. Stralfors, A. Hiraga and P. Cohen. The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1985; 149:295-303.
- [226] P. H. Sugden and A. Clerk. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998; 83:345-52.
- [227] P. H. Sugden and A. Clerk. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 1998; 76:725-46.
- [228] C. Sumbilla, M. Cavagna, L. Zhong, H. Ma, D. Lewis, I. Farrance and G. Inesi. Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1999; 277:H2381-91.
- [229] M. Tada, M. Yabuki and T. Toyofuku. Molecular regulation of phospholamban function and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 853:116-29.
- [230] P. M. Tang, J. A. Bondor, K. M. Swiderek and A. A. DePaoli-Roach. Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *J Biol Chem* 1991; 266:15782-9.
- [231] M. Terrak, F. Kerff, K. Langsetmo, T. Tao and R. Dominguez. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 2004; 429:780-4.
- [232] T. Tokui, F. Brozovich, S. Ando and M. Ikebe. Enhancement of smooth muscle contraction with protein phosphatase inhibitor 1: activation of inhibitor 1 by cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220:777-83.

- [233] H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4.
- [234] J. A. Towbin and N. E. Bowles. The failing heart. *Nature* 2002; 415:227-33.
- [235] M. Ungerer, M. Bohm, J. S. Elce, E. Erdmann and M. J. Lohse. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993; 87:454-63.
- [236] M. Ungerer, G. Parruti, M. Bohm, M. Puzicha, A. DeBlasi, E. Erdmann and M. J. Lohse. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 1994; 74:206-13.
- [237] V. N. Uversky. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 2002; 269:2-12.
- [238] M. A. van der Heyden, T. J. Wijnhoven and T. Opthof. Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res* 2005; 65:28-39.
- [239] L. Vittone, C. Mundina-Weilenmann, M. Said and A. Mattiazzi. Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart. *J Biol Chem* 1998; 273:9804-11.
- [240] K. S. Walker, P. W. Watt and P. Cohen. Phosphorylation of the skeletal muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in response to adrenaline in vivo. *FEBS Lett* 2000; 466:121-4.
- [241] Y. Wang, S. Huang, V. P. Sah, J. Ross, Jr., J. H. Brown, J. Han and K. R. Chien. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273:2161-8.
- [242] T. Watanabe, H. B. Huang, A. Horiuchi, E. F. da Cruze Silva, L. Hsieh-Wilson, P. B. Allen, S. Shenolikar, P. Greengard and A. C. Nairn. Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:3080-5.
- [243] K. A. Webster, D. J. Discher and N. H. Bishopric. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1993; 268:16852-8.
- [244] A. D. Wegener, H. K. Simmerman, J. P. Lindemann and L. R. Jones. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1989; 264:11468-74.
- [245] WHO. WHO 2004.
- [246] K. R. Williams, H. C. Hemmings, Jr., M. B. LoPresti, W. H. Konigsberg and P. Greengard. DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein. Primary structure and homology with protein phosphatase inhibitor-1. *J Biol Chem* 1986; 261:1890-903.
- [247] W. Wong and J. D. Scott. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:959-70.
- [248] Y. Xiang and B. K. Kobilka. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* 2003; 300:1530-2.
- [249] F. Yang, L. G. Moss and G. N. Phillips, Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1246-51.
- [250] M. Yano, Y. Ikeda and M. Matsuzaki. Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115:556-64.
- [251] K. Yoshida, M. Watanabe, H. Kato, A. Dutta and S. Sugano. BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Lett* 1999; 460:93-8.
- [252] M. Zaccolo, P. Magalhaes and T. Pozzan. Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:160-6.

- [253] D. Zechner, D. J. Thuerauf, D. S. Hanford, P. M. McDonough and C. C. Glembotski. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* 1997; 139:115-27.
- [254] R. Zhang, M. S. Khoo, Y. Wu, Y. Yang, C. E. Grueter, G. Ni, E. E. Price, W. Thiel, S. Guatimosim, L. S. Song, E. C. Madu, A. N. Shah, T. A. Vishnivetskaya, J. B. Atkinson, V. V. Gurevich, G. Salama, W. J. Lederer, R. J. Colbran and M. E. Anderson. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* 2005; 11:409-17.
- [255] W. H. Zimmermann, C. Fink, D. Kralisch, U. Remmers, J. Weil and T. Eschenhagen. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 2000; 68:106-14.
- [256] W. H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, P. Schubert, M. Didie, F. Munzel, J. F. Heubach, S. Kostin, W. L. Neuhuber and T. Eschenhagen. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90:223-30.

8 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

1. Ditz D., Pamminger T., El-Armouche A., Eschenhagen T. Effect of Green Fluorescent Protein encoding adenoviral vectors on contractility in cardiac myocytes. Posterpräsentation an der 43. Frühjahrstagung der "Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie". Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2002 Mar; 365 Suppl.1:366.
2. 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 β -adrenergic signaling. FASEB J 2003; 17:437-439.
3. El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. Cardiovasc Res 2004; 6:87-93.
4. 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; 346:700-6.

9 Anhang

9.1 Chemikalien

Soweit nicht bereits im Text angegeben sind für die Erstellung dieser Arbeit die nachfolgend aufgeführten Substanzen verwendet worden. Alle Chemikalien wurden mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

PCR und Sequenzierung

DNA Polymerase (AmpliTaq Gold, 5 U/μl)	Applied Biosystems, Weiterstadt
dNTP	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Frist Strand Puffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
M-MLV reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
PCR Puffer II (10x)	Applied Biosystems, Weiterstadt
peqGOLD Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD 100 bp und 1 kb DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg bei München
Random Primer (p(dN) ₆)	Roche Diagnostics, Mannheim
Sequenziermix (Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
DNA Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
 <u>Virusklonierung</u>	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt am Main

BJ5183	Stratagene, La Jolla, California, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
DH10B	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporationsküvette	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Enzyme (BamH I, EcoR I, Eco0109 I, Hpa I, Kpn I, Nde I, Pac I, Pme I, Xba I)	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Hefe	BD Biosciences, Heidelberg
Kanamycin (50 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
KOH	Sigma, Deisenhofen
Macherey Nagel Kit zur Plasmidisolierung	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
peqGOLD Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD 100 bp und 1 kb DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg bei München
Puffer 1-4	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Rinderserumalbumin (BSA) 10x	New England BioLabs, Frankfurt am Main
DNA Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

Silikonöl	Applied Biosystems, Weiterstadt
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase Puffer (ATP) 10x	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
<u>Kultur von HEK 293-Zellen</u>	
Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	Biochrom, Belin
fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kollagen I	Upstate Group, Milton Keynes, GB
Na ₃ Citrat · (H ₂ O) ₂	Merck KgaA, Darmstadt
optiMEM	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS ohne Calcium und Magnesium 10x	Biochrom AG, Berlin
P/S	Biochrom, Berlin
<u>Präparation hochtitriger Virussuspensionen</u>	
β-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
CsCl	Sigma, Deisenhofen
Dimethylfomamid (DMF)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck KgaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma, Deisenhofen
K ₄ [Fe(CN) ₆] · (H ₂ O) ₃	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂ · (H ₂ O) ₆	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA, Darmstadt

Phenol	Merck KgaA, Darmstadt
Proteinase K	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
1,1,2-Trichlortrifluorethan (Uvasol®)	Merck KgaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl	Merck KgaA, Darmstadt
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Zellpräparation, Herstellung und Kultur von EHTs und KM

[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Applichem, Darmstadt
10 x Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM) Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA, Darmstadt
DNase II, Typ V	Sigma, Taufkirchen
Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
flüssiges Silikon	Dow Corning, Wiesbaden
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MgSO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
Minimum Essential Medium – Earle (MEM)	Biochrom, Berlin
Na ₂ HPO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
P/S	Biochrom, Berlin
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, certified crude 1:250	Difco, Detroit, USA

Kontraktionsexperimente

2,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma, Taufkirchen
CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen

Formaldehyd-Lösung 37%	Roth, Karlsruhe
L-(+)-Ascorbinsäure	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck KgaA, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe

Proteinmethoden

Acrylamid 4K Lösung 30 %	Appllichem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Steinheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Appllichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Appllichem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck KgaA, Darmstadt
NaF	Merck KgaA, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Prestained Rainbow	Bio-Rad, München
Prestained Seablue	Bio-Rad, München
Prestained broad range, SDS-PAGE standard	Bio-Rad, München
Roti-Mark	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Appllichem, Darmstadt
Triton-X 100	Fluka, Steinheim

RNA-Methoden

Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt

Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ficoll	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lachssperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Natriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Taufkirchen
Reaktionspuffer (10x)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen

Phosphatase Assay

Ammoniumsulfat	Merck KgaA, Darmstadt
Adenosintriphosphat (ATP)	Serva, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Darmstadt
CaCl ₂	Sigma, Deisenhofen
γ [³² Phosphor] Adenosintriphosphat (ATP), 1 mCi	Hartmann Analytic, Braunschweig
Koffein	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt
Phosphorylase b	Sigma, Deisenhofen
Phosphorylase Kinase	Sigma, Deisenhofen
Proteinkinase A	Sigma, Deisenhofen
Proteinphosphatase 1	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCL)	Merck KgaA, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen

Immunhistochemie

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden

Propidiumiodid	Molecular Probes, Eugene, USA
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen

Allgemein verwendete Chemikalien

<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Baxter, Unterschleißheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
HCl 32 %	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	Merck KgaA, Darmstadt
NaOH	Applichem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat SDS	Merck KgaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt

9.2 Hilfsmittel und Geräte

Dehnapparat	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen
Dialysekassetten: Slide-A-Lyzer® 10K MWCO	Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammern/blotkammern (Mini Trans-Blot Cell)	Bio-Rad, München
Sub-Cell GT und Mini-Sub-Cell GT	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300)	Bio-Rad, München
Elektroporator	Bio-Rad, München
Elektroporationsküvette	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gel Doc 2000 Gel Documentation System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasschalen	Roth, Karlsruhe
Incucell 111, Inkubator	MMM Group, Planegg
Heparinspritzen: Injekt-H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen	Microlance™, BD Medical Pharmaceutical Systems, Le Pont-De-Claix, Frankreich
Kippwippe	Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge, Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Lasermikroskop LSM, Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena
MicroAmp optical tubes und caps	Applied Biosystems, Weiterstadt
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Nitrocellulosemembran, Protran®	Schleicher & Schüll, Dassel
Organbäder	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, UKE Hamburg

DNA Thermal Cycler	PerkinElmer, Wellesley, USA
Photometer (Smart Spec 3000)	Bio-Rad, München
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfen (Easypet)	Eppendorf, Hamburg
Politron	Kinematica, Luzern, Schweiz
Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) Hybond™-P	Amersham Biosciences, Freiburg
Quarzglasküvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rollmischer (Assistent RM 5)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Schüttler im Incucell, Modell 305	GFL, Burgwedel
Silikondocht	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Szintillationszähler, Beckmann LS 1801	Beckman Coulter, Krefeld
Teflonscheiben	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen
Teflonzylinder	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen
Thermoblöcke (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler (PE 9600)	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau- Jügesheim
Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman Coulter, Krefeld
USF Reinstwassersystem	USF Deutschland, Ransbach- Baumbach
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbäder (C20 CS)	Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturschalen	Corning, Acton, USA
Falcon Zellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschränke (IG 150)	Jouan, Unterhaching
Zellsieb	Zefa Laborcenter, München
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge 5415 D

Eppendorf, Hamburg

Zentrifugenröhrchen

Sarstedt, Nümbrecht

9.3 Ergebnistabellen

Zu **Abb. 3.13**: AdEGFP/PPI-1 Virustitration und deren densitometrische Auswertung.

MOI	0,25	0,5	0,67	0,75	1	1,34	2	2,68
PPI-1	0,008	0,058	0,247	0,429	0,638	1,015	1,172	0,940

Zu **Abb. 3.15**: Zeitabhängige PPI-1 Überexpression und deren densitometrische Auswertung.

h	6	12	24	48
PPI-1	0,015	0,519	1,515	2,675

Zu **Abb. 3.20 A**: PP-Aktivität aufsteigender Konzentrationen rekombinanter PP1.

c(PP1) [μ g]	0,000062	0,000125	0,000250	0,0005	0,0025
PP-Aktivität [DPM]	81,5	379	3131,000	2754,5	13682

Zu **Abb. 3.20 B**: PP-Aktivität rekombinanter PP1 unter aufsteigenden Konzentrationen von PPI-1 und Phosphothreonin³⁵-PPI-1 (pT35-PPI-1) in Zelllysaten von KMNR.

c(PPI-1 bzw. pT ³⁵ -PPI-1) [μ g]	PPI-1			Phosphothreonin ³⁵ -PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,005	4857	114,7	2	4857	114,7	2
0,05	4806	45,6	2	4372	172,5	2
0,5	4577	25,1	2	4366	348,9	2
5	4591	74,3	2	4509	564,1	2
50	4292	43,4	2	1820	282,1	2
500	2962	106,8	2	203	184,4	2
2500	1523	262,6	2	-58	59,4	2

Zu **Abb. 3.21**: Kumulative Aktivität der PP1 und 2A.

	basal			mit Isoprenalinstimulation 1 nM		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n
Kontrolle	0,82	0,05	10	0,81	0,05	10
AdEGFP	1,06	0,05	10	1,07	0,06	10
AdEGFP/PPI-1	1,50	0,06	10	1,51	0,08	10
AdEGFP/PPI-1(-1-65,T35D)	0,91	0,09	10	0,90	0,08	10
AdLacZ	0,71	0,01	3	0,81	0,05	2
AdPPI-1	1,10	0,08	3	1,16	0,05	3

Zu **Abb. 3.22**: PP-Aktivität in unbehandelten KMNR ohne und nach PKA-Stimulation.

PP-Aktivität [DPM]	Kontrolle	mit PKA
	4743	2597
	4972	2698
MW	4857	2648
SEM	114,7	50,9

Zu Abb. 3.23 A: Kontraktionskraft unter Calcium in mN

Ca ²⁺ [mmol]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,2	0,67	0,05	11	0,36	0,03	16	0,25	0,02	14
0,4	1,06	0,05	11	0,64	0,05	16	0,42	0,04	14
0,8	1,24	0,06	11	0,77	0,06	16	0,51	0,05	14
1,2	1,32	0,07	11	0,81	0,07	16	0,54	0,05	14
1,6	1,36	0,07	11	0,84	0,07	16	0,55	0,06	14
2	1,38	0,08	11	0,85	0,07	16	0,56	0,06	14
2,4	1,40	0,08	11	0,86	0,08	16	0,57	0,06	14
2,8	1,42	0,08	11	0,86	0,08	16	0,58	0,06	14

Zu Abb. 3.23 B: Kontraktionskraft unter Isoprenalin in mN

Isoprenalin [nM]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0,51	0,05	11	0,31	0,02	16	0,20	0,02	14
0,1	0,54	0,05	11	0,33	0,02	16	0,24	0,03	14
0,3	0,58	0,04	11	0,39	0,03	16	0,28	0,04	14
1	0,67	0,03	11	0,46	0,04	16	0,32	0,05	14
3	0,76	0,03	11	0,50	0,05	16	0,35	0,05	14
10	0,85	0,04	11	0,54	0,05	16	0,37	0,05	14
30	0,90	0,04	11	0,56	0,06	16	0,38	0,05	14
100	0,93	0,05	11	0,58	0,06	16	0,39	0,06	14
300	0,94	0,05	11	0,58	0,06	16	0,39	0,06	14
1000	0,95	0,05	11	0,58	0,06	16	0,39	0,06	14

Zu Abb. 3.23 C: Änderung der Kontraktionskraft unter Calcium in mN

Ca ²⁺ [mmol]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,2	0	0	11	0	0	16	0	0	14
0,4	0,38	0,04	11	0,28	0,04	16	0,17	0,03	14
0,8	0,57	0,06	11	0,41	0,06	16	0,26	0,04	14
1,2	0,64	0,07	11	0,45	0,07	16	0,28	0,05	14
1,6	0,68	0,08	11	0,48	0,07	16	0,30	0,05	14
2	0,71	0,08	11	0,49	0,07	16	0,31	0,05	14
2,4	0,73	0,08	11	0,50	0,08	16	0,32	0,05	14
2,8	0,74	0,09	11	0,50	0,08	16	0,32	0,05	14

Zu Abb. 3.23 D: Änderung der Kontraktionskraft unter Isoprenalin in mN

Isoprenalin [nM]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0	0	11	0	0	16	0	0	14
0,1	0,02	0,01	11	0,02	0,01	16	0,04	0,01	14
0,3	0,06	0,01	11	0,07	0,01	16	0,09	0,02	14
1	0,16	0,02	11	0,14	0,03	16	0,13	0,03	14
3	0,28	0,03	11	0,19	0,03	16	0,15	0,03	14
10	0,38	0,04	11	0,22	0,04	16	0,17	0,03	14
30	0,44	0,04	11	0,25	0,05	16	0,18	0,04	14
100	0,47	0,05	11	0,27	0,05	16	0,19	0,04	14
300	0,49	0,05	11	0,27	0,05	16	0,19	0,04	14
1000	0,50	0,05	11	0,26	0,05	16	0,20	0,04	14

Zu Abb. 3.26 A: Änderung der Kontraktionskraft in Prozent vom Maximum des Effekts unter Isoprenalin in mN

Isoprenalin [nM]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	0	0	11	0	0	16	0	0	14
0,1	6	1,51	11	10	1,87	16	20	5,39	14
0,3	17	3,95	11	27	2,83	16	42	5,02	14
1	37	5,30	11	52	3,48	16	60	5,38	14
3	58	4,69	11	70	2,56	16	76	3,15	14
10	77	3,31	11	82	1,65	16	87	1,54	14
30	88	2,47	11	92	1,54	16	93	1,45	14
100	96	1,32	11	96	0,99	16	97	1,15	14
300	98	0,54	11	99	0,56	16	98	1,09	14
1000	100	0	11	99	1,05	16	100	0	14

Zu Abb. 3.26 B: Logarithmisierte Werte der halbmaximale Effektorkonzentration (EC_{50}) von Isoprenalin

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
-8,68	0,11	11	-8,98	0,05	16	-9,27	0,11	14

Zu Abb. 3.28: Relaxationszeit unter Isoprenalin in ms

Isoprenalin [nM]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0	107,71	4,08	7	117,82	6,74	11	120,67	11,93	6
0,1	108,00	2,76	7	117,00	6,60	12	124,33	14,49	6
0,3	105,43	3,64	7	110,50	6,92	12	110,67	7,77	6
1	90,86	3,20	7	102,00	7,18	12	105,67	9,98	6
3	78,00	2,05	7	93,50	5,71	12	101,00	9,52	6
10	75,14	2,09	7	90,83	5,02	12	98,33	9,17	6
30	75,14	2,26	7	90,50	4,37	12	98,33	9,88	6
100	76,57	1,89	7	91,00	4,00	12	99,67	7,70	6
300	78,29	2,02	7	91,67	3,85	12	104,33	9,33	6
1000	77,71	2,16	7	91,67	4,23	12	96,33	4,01	6

Zu Abb. 3.29: Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung unter aufsteigenden Isoprenalinkonzentrationen

Isoprenalin [nM]	Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,001	0,31	0,02	3	0,29	0,07	3	0,44	0,10	3
0,01	0,74	0,21	3	0,75	0,15	3	0,57	0,12	3
0,1	1,32	0,32	3	0,90	0,21	3	1,58	0,16	3
1	1,19	0,29	3	1,24	0,08	3	1,41	0,24	3
10	1,42	0,28	3	1,10	0,05	3	1,32	0,29	3
100	1,05	0,18	3	1,47	0,41	3	1,40	0,12	3

Zu Abb. 3.30 C: Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung ohne Isoprenalinstimulation

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1			AdEGFP/ PPI-1 _(-1-65,T35D)		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,46	0,06	10	0,89	0,08	11	0,84	0,06	11	0,94	0,06	4

Zu Abb. 3.30 D: Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung nach 1 nM Isoprenalin-stimulation

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1			AdEGFP/ PPI-1 _(-1-65,T35D)		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,84	0,07	10	0,94	0,05	11	0,97	0,05	11	1,19	0,05	4

Zu Abb. 3.31 C: Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung ohne Isoprenalinstimulation

Kontrolle			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,22	0,22	2	0,23	0,06	3	0,55	0,09	3

Zu Abb. 3.31 D: Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung nach 1 nM Isoprenalin-stimulation

Kontrolle			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,39	0,02	3	0,50	0,19	3	0,69	0,16	3

Zu Abb. 3.33 C: p38-Phosphorylierung unter 1 nM Isoprenalinstimulation

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,55	0,21	3	0,26	0,09	3	0,55	0,10	3

Kontrolle			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,61	0,16	4	0,84	0,17	4	1,42	0,35	4

Zu Abb. 3.34 C: Gehalt an stimulierendem G-Protein (G_s)

Kontrolle			AdEGFP		
MW	SEM	n	MW	SEM	n
4,09	1,04	4	5,37	0,47	4

Zu Abb. 3.34 D: Gehalt an inhibierendem G-Protein (G_i)

Kontrolle			AdEGFP		
MW	SEM	n	MW	SEM	n
1,80	0,14	4	1,92	0,23	4

Zu Abb. 3.35: cAMP-Akkumulation in KMNR normiert auf die Kontrollen einer Serie

Basal								
Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,7	0,2	7	0,8	0,2	7	0,7	0,2	7

Isoprenalin 10 μ M								
Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
72,2	11,0	7	76,1	7,5	7	56,3	7,9	7

Forskolin 15 μ M								
Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
100,0	8,3	7	93,3	4,6	7	79,4	11,2	7

Zu Abb. 3.37: Zellfläche der KMNR in μm^2

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
4528	175	64	3804	310	24	3627	296	24	4547	417	21	4884	313	23

Zu Abb. 3.38 A: Proteinkonzentration der KMNR in Prozent vom Mittelwert der Kontrollen

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1			AdEGFP/ PPI-1 _(-1-65,T35D)			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
100	3,5	20	105	6,5	20	113	4,5	20	118	5,0	20	146	14,3	5	132	11,6	6

Zu Abb. 3.38 B: RNA-Konzentration der KMNR in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Kontrolle			AdEGFP			AdEGFP/PPI-1			AdLacZ			AdPPI-1		
MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,52	0,03	10	0,73	0,03	10	0,66	0,04	9	0,53	0,02	10	0,57	0,02	10

10 Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Überlassung der sehr interessanten und methodisch ausserordentlich vielseitigen Aufgabenstellung sowie für die fachkundige und geduldige Unterstützung und Förderung,

ganz besonders Herrn Dr. med. Ali El-Armouche für die ausgesprochen herzliche und umfassende Betreuung während der experimentellen Arbeiten und die unerschöpfliche Geduld und Motivation während der Zeit danach,

Herrn Dr. med. Oliver Zolk für seine fachkundigen Ratschläge, wann immer ich sie brauchte, Herrn Dr. med. Thomas Rau für die Weitergabe von theoretischen und statistischen Grundlagen, Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Zimmermann für Tips und Tricks um EHTs,

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. med. W. Schmitz für die Möglichkeit in Ihrem Labor zu hospitieren, Herrn PD Dr. rer. nat. Peter Boknik für die praktische Unterweisung in der radioaktiven Bestimmung der Phosphataseaktivität, Frau Dr. med. vet. Nicole Brüchert für die breitwillige und liebevolle Unterstützung dabei, ihr und Herrn Dr. rer. nat. Felix Balzer für die herzliche Aufnahme in Münster,

Herrn Torsten Pamminger für die schönen, wenn auch nicht immer einfachen Zeiten im Labor und im Examen, ich denke wir haben beide sehr viel gelernt,

Herrn Dr. rer. nat. Felix Münzel und Frau Dr. rer. nat. Ulrike Mühlhäuser für die emotionale Unterstützung und die anregenden Diskussionen über naturwissenschaftliche Arbeitsweise,

Herrn Ingo Schubert für die umfangreiche labortechnische Unterstützung rund um die Molekularbiologie, Frau Beate Endress für die unermüdliche Präparation von Kardiomyozyten neugeborener Ratten, sowie auch Sabine Langer und Sven Engmann für Ihre labortechnische Hilfe,

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Erlangen und Hamburg

und schlußendlich bedanke ich mich ganz herzlich und mit viel Liebe bei meiner Mutter - Edith Ditz – die mich während meiner gesamten Ausbildung großzügig finanziell unterstützt hat und mir dabei sehr viel Freiraum für meine persönliche Entwicklung ließ.

11 Lebenslauf

Name Diana Maria Ditz
Geburtsdatum 23. April 1977
Eltern Edith und Franz Ditz

Schulbildung

1983-1985 Grundschule Einweging
1985-1987 Grundschule Kirchaitnach
1987-1996 Gymnasium Viechtach

Hochschulbildung

1996-1997 Studium der Chemie an der Universität Regensburg

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen
04/1999 Physikum
08/2000 Erstes Staatsexamen
05/2001-11/2002 Experimentelle Forschungsarbeit, die die Grundlage der
vorliegenden Arbeit bildet
04/2003 Zweites Staatsexamen
11/2004 Drittes Staatsexamen
12/2004 Approbation

Berufstätigkeit

11/2005-03/2007 Assistenzärztin an der Universitätsklinik Leipzig A.ö.R., Medizin-
ische Klinik II, Abteilung Hämatologie
seit 04/2007 Assistenzärztin an der Universitätsklinik Regensburg, Abteilung für
Hämatologie und Onkologie

12 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Desweiteren habe ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.