

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

Zur Bedeutung des Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz

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

vorgelegt von
Torsten Pamminger

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 29.09.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. Dr. Sonja Schrepfer

***meinen lieben Eltern
Hans und Johanna
gewidmet***

***Jeder junge Wissenschaftler sollte stets die Möglichkeit im Auge behalten,
dass ein vermeintlich irritierendes Versagen von Labortechnik, das zu
inkonsistenten Ergebnissen führt, ein- oder zweimal im Leben auch ein
Hinweis auf großartige Entdeckungen sein könnte.***

Patrick Blackett (1897 - 1974)

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Ätiologie und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	1
1.2	Das sympathische Nervensystem	2
1.2.1	Die β -adrenerge Signaltransduktion	3
1.2.2	Veränderungen der β -adrenergen Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz	5
1.2.3	Die Serin/Threonin Proteinphosphatasen	6
1.2.4	Der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1	8
1.3	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	11
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>12</u>
2.1	Menschliche Herzproben	12
2.2	Arbeitstechniken mit RNA	12
2.2.1	Gesamt-RNA-Präparation aus Gewebe	12
2.2.2	RNA Elektrophorese	13
2.2.3	RNA Transfer	13
2.2.4	Herstellung und Markierung radioaktiver Sonden	14
2.2.5	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde	14
2.2.6	Hybridisierung und Autoradiographie	15
2.3	Arbeitstechniken mit DNA	16
2.3.1	Allgemeine Techniken	16
2.3.1.1	Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien	16
2.3.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterienzellen	16
2.3.1.3	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen	17
2.3.2	Herstellung der cDNA für die Northern Blot Sonde	18
2.3.2.1	Inhibitor-1 cDNA-Synthese	18

2.3.2.2	Vermehrung und Separation der cDNA	19
2.3.3	Herstellung des rekombinanten Inhibitor-1 Proteins	20
2.3.3.1	Herstellung der Inhibitor-1 cDNA	22
2.3.3.2	Linearisierung des Expressionsvektors	23
2.3.3.3	Restriktionsverdau der Inhibitor-1 cDNA und Ligation mit dem pGEX Vektor	24
2.3.3.4	Transformation des Ligationsansatzes in elektrokompetente <i>E. coli</i> DH10B	24
2.3.3.5	Plasmidisolation	24
2.3.3.6	Restriktionsverdau und Sequenzierung	25
2.3.3.7	Expression und Aufreinigung des rekombinanten Inhibitor-1 Proteins	26
2.3.4	Aufreinigung des Anti-Inhibitor-1 Antikörperserums	27
2.4	Proteinchemische Arbeitstechniken	29
2.4.1	Herstellung von Proteinhomogenaten	29
2.4.2	Trichloressigsäure Extraktion	30
2.4.3	Immunpräzipitation	31
2.4.4	Proteinbestimmung	32
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.4.6	Proteindarstellung in SDS-Polyacrylamidgelen	33
2.4.7	Western Blot	34
2.4.8	Erfassung und Verarbeitung der Daten	37
2.5	Adenovirale Expressionssysteme	37
2.5.1	Vorbereitung der Transfektion viraler Konstrukte	39
2.5.2	Virusanzucht	40
2.5.2.1	Zellkultur von HEK 293T-Zellen	40
2.5.2.2	Transfektion des Ligationsprodukts	41
2.5.2.3	Konzentration und Aufreinigung der Virussuspension	42

2.5.2.4	Dichtebestimmung der biologisch aktiven Viren	43
2.5.2.5	Virustitrierung	43
2.6	Zellkulturmethoden	44
2.6.1	Herstellung einer Kultur primärer Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen	44
2.6.1.1	Tierhaltung	44
2.6.1.2	Organentnahme	44
2.6.1.3	Trypsinverdau	44
2.6.1.4	Kulturbedingungen	47
2.6.1.5	Intervention	48
2.7	Immunzytochemie	48
2.8	Statistik	49
3	<u>Ergebnisse</u>	<u>50</u>
3.1	Northern-Blot-Analyse von Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen	50
3.2	Inhibitor-1 in SDS-Standardhomogenaten menschlicher Herzen nach Carr et al. (2002)	53
3.3	Test des Antikörperserums an Proteinhomogenaten mit adenoviral überexprimiertem Inhibitor-1 und Vergleich mit Präimmunserum	55
3.4	Immunzytologischer Test des Antikörperserums	57
3.5	Aufreinigung des Inhibitor-1 Antikörperserums	58
3.6	Immunpräzipitation	66
3.7	Trichloressigsäure-Extrakte	67
3.8	Proteinchemische Untersuchung insuffizienter menschlicher Herzen in	

Trichloressigsäure-Extrakten und Gesamthomogenaten	69
3.9. Einfluss von Calcineurin auf die Dephosphorylierung von Inhibitor-1	77
<u>4</u> Diskussion	<u>80</u>
4.1 Die immunologische Detektion des Inhibitor-1	80
4.1.1 Der Inhibitor-1 Antikörper	81
4.1.2 Versuch der Anreicherung von Inhibitor-1 mit Hilfe der Immunpräzipitation	83
4.1.3 Anreicherung von Inhibitor-1 mittels Trichloressigsäure-Extraktion	84
4.2 Der Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen	85
4.2.1 Auswahl und Problematik menschlicher Herzproben	86
4.2.2 Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz	87
4.2.2.1 mRNA Menge von Inhibitor-1	87
4.2.2.2 Proteinkonzentration von Inhibitor-1	87
4.2.2.3 Interpretation der Ergebnisse	88
4.2.3 Untersuchung von Phosphatase-1, Troponin-I und Phospholamban	89
4.2.4 Einordnung unserer Ergebnisse	91
4.3 Der Einfluss von Calcineurin auf die Threonin ³⁵ -Phosphorylierung von Inhibitor-1	93
4.3.1 Auswahl und Problematik der verwendeten Methoden	93
4.3.2 Der Einfluss der Calcineurinhemmung auf die Inhibitor-1-Threonin ³⁵ und Phospholamban-Serin ¹⁶ Phosphorylierung	94
<u>5</u> Zusammenfassung	<u>97</u>
<u>6</u> Abkürzungsverzeichnis	<u>99</u>

<u>7</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>101</u>
<u>8</u>	<u>Verzeichnis der Veröffentlichungen</u>	<u>118</u>
<u>9</u>	<u>Anhang</u>	<u>119</u>
9.1	Chemikalien	119
9.2	Geräte und Hilfsmittel	121
<u>10</u>	<u>Danksagung</u>	<u>122</u>
<u>11</u>	<u>Lebenslauf</u>	<u>123</u>
<u>12</u>	<u>Erklärung</u>	<u>124</u>

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz ist dadurch charakterisiert, dass das Herz nicht in der Lage ist, die Sauerstoffversorgung des Organismus trotz ausreichenden venösen Blutangebots zu gewährleisten. Dies hat klinische Symptome zur Folge, die gemäß den Empfehlungen der *New York Heart Association* eine Einteilung in 4 klinische Stadien erlaubt. Sie ist in der Regel eine fortschreitende Erkrankung, die häufig zum Tode führt. Ihre Prävalenz in der westeuropäischen Bevölkerung nimmt kontinuierlich zu und beträgt zurzeit 2%, bei den über 65-Jährigen 6% (Murphy 2004). Zusammen mit der chronisch ischämischen Herzerkrankung (9,6%) und dem akuten Myokardinfarkt (7,3%) steht die chronische Herzinsuffizienz (5,3%) an der Spitze der Todesursachenstatistik (Statistisches Bundesamt 2006). Nach Diagnosestellung beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 40-50% (Eschenhagen 1998), nach der ersten Krankenhauseinweisung nur noch 25% (Stewart 2001). Somit ist die Herzinsuffizienz in ihrer gesellschaftlichen Bedeutung den Malignomen vergleichbar und stellt eines der bedeutendsten Probleme der modernen Medizin dar (Eschenhagen und Weil 1998).

Unter klinischen Gesichtspunkten sind die führenden Symptome Luftnot und schnelle Ermüdbarkeit. Die Ursache ist in der Regel eine kardiale Grunderkrankung (Remme 2001; Swedberg 2006). Die kardialen Ursachen der Herzinsuffizienz lassen sich nach herzmuskelmechanischen Kriterien einteilen in Veränderungen der Vorlast (z. B. infolge einer Mitralklappeninsuffizienz), Nachlast (insbesondere als Folge einer Hypertonie) und Kontraktilität (z. B. durch eine Myokarditis). Letztlich führen diese verschiedenen Ursachen zu Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion sowie der Genexpression im Sinne eines kardialen *Remodeling*, was langfristig die kardiale Dysfunktion perpetuiert. Diese Veränderungen umfassen den kontraktilen Apparat, den Zellmetabolismus, die extrazelluläre Matrix der Herzmuskelzellen, verschiedene Iontentransportproteine und verschiedene Signaltransduktionswege (Tab. 1.1). Eine große Rolle spielt dabei vermutlich eine dauerhafte Aktivierung neurohumeraler Systeme (Sympathikus; Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Kurzfristig stabilisieren diese Systeme zwar die Myokardfunktion, aber bei einer chronischen Aktivierung tragen dieselben Mechanismen wesentlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei (Eschenhagen 2008). Dies wird auch durch klinische Studien belegt, die eine Prognoseverbesserung durch eine Therapie mit ACE-Hemmern und β -Blockern ergeben haben.

Im Folgenden wird die Rolle des sympathischen Nervensystems und hier insbesondere der β -adrenergen Signalkaskade in der Herzinsuffizienz dargestellt.

Tabelle 1.1: Kardiale und extrakardiale Veränderungen bei chronischer Herzinsuffizienz

Veränderungen	
Funktionell	Abgeschwächter Frank-Starling-Mechanismus
Strukturell	Linksventrikuläre Dilatation Myokardhypertrophie Apoptose Fibrose
Elektrophysiologisch	Tachykardie Arrhythmie
Neurohumoral	Aktivierung des RAAS Aktivierung des Sympathikus Steigerung der Endothelinsynthese Steigerung von ANP und BNP Proinflammatorische Zytokine Reduktion der NO-Synthese
Zellulär	Kalziumüberladung Verlängerte Relaxation
Molekular	Expression fetaler Isoformen bestimmter Gene Induktion von Neurohormonen Desensitivierung der β_1 -Adrenozeptoren Verminderte Expression der SERCA Vermehrte Expression des sarkolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers

1.2 Das sympathische Nervensystem

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt durch die Freisetzung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin zu einer erheblichen Zunahme der Kontraktilität und Herzfrequenz (Schnabel 1999). Die Signaltransduktion erfolgt über Adrenozeptoren, die sich in α - und β -Adrenozeptoren unterteilen lassen.

1.2.1 Die β -adrenerge Signaltransduktion

β -Adrenozeptoren werden in die Subtypen β_1 , β_2 , und β_3 unterteilt. Das Verhältnis von β_1 zu β_2 im Herzen ist 70:30 (Brodde 2006). Die Aktivierung beider Subtypen erhöht die Herzfrequenz und Kontraktilität (Brodde 1999), während die Stimulation des β_3 -Adrenozeptors negativ inotrop wirkt (Gauthier 2000). Ihre Rolle wird jedoch in der Herzinsuffizienz kontrovers diskutiert und bleibt ungewiss (Heubach 2002).

Die Stimulation der β -Adrenozeptoren führt über G-Proteine zur Aktivierung der Adenylylcyclase und somit zur vermehrten Bildung von cAMP, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die Proteinkinase A phosphoryliert unter anderem wichtige Zielproteine, wie den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, Troponin-Inhibitor, Phospholamban an Serin¹⁶ (PLB-Ser¹⁶) und den Phosphatase-Inhibitor-1 (Inhibitor-1). Die Phosphorylierung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Rapundalo 1998) führt zu einem gesteigerten Ca^{2+} Einstrom in die Zelle und zu einer gesteigerten Ca^{2+} Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum (SR). Die Sensitivität des Ca^{2+} freisetzenden Kanals wird wahrscheinlich durch die PKA vermittelte Phosphorylierung des Ryanodinrezeptors erhöht (Fill und Capello 2002). Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an regulatorische Proteine wie z.B. am Troponinkomplex. Zu diesem gehören das Ca^{2+} bindende Troponin C, das Troponin T und der Troponin-Inhibitor (Troponin-I). Die Phosphorylierung von Troponin-I führt zu einer verminderten Sensitivität der Ca^{2+} -Bindungsstelle an Troponin C, was wiederum eine schnellere Zellrelaxation zur Folge hat (Zhang 1995). Die Wiederaufnahme des freigesetzten Ca^{2+} in das SR wird durch Phospholamban reguliert, welches wiederum die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) beeinflusst. Unphosphoryliert inhibiert Phospholamban die SERCA, die entscheidend für die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR ist. Die Phosphorylierung von Phospholamban durch die PKA an Phospholamban-Ser¹⁶ und durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II am Threonin¹⁷ hebt den hemmenden Effekt auf (Wegener 1989) und die Affinität der SERCA zu freiem Ca^{2+} steigt an, so dass die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR schneller erfolgt. Im SR ist Ca^{2+} vorwiegend an Calsequestrin gebunden (Campbell 1983; Ikemoto 1989). Phospholamban selbst wird durch die Phosphatase-1 wieder dephosphoryliert, welche wiederum durch den an Threonin³⁵ phosphorylierten Inhibitor-1 gehemmt wird (Cohen 1989; Neumann 1993; Gupta 1996). Somit führt die Aktivierung der β_1 -adrenergen Signalkaskade über die Aktivierung der PKA und der damit verbundenen Phosphorylierung von Phospholamban zur Aktivierung der SERCA. Hierdurch wird Ca^{2+} schneller im SR aufgenommen und führt so zur beschleunigten Relaxation. Durch den höheren Ca^{2+} Gehalt im SR kann auch mehr Ca^{2+} freigesetzt werden, was positiv inotrop wirkt.

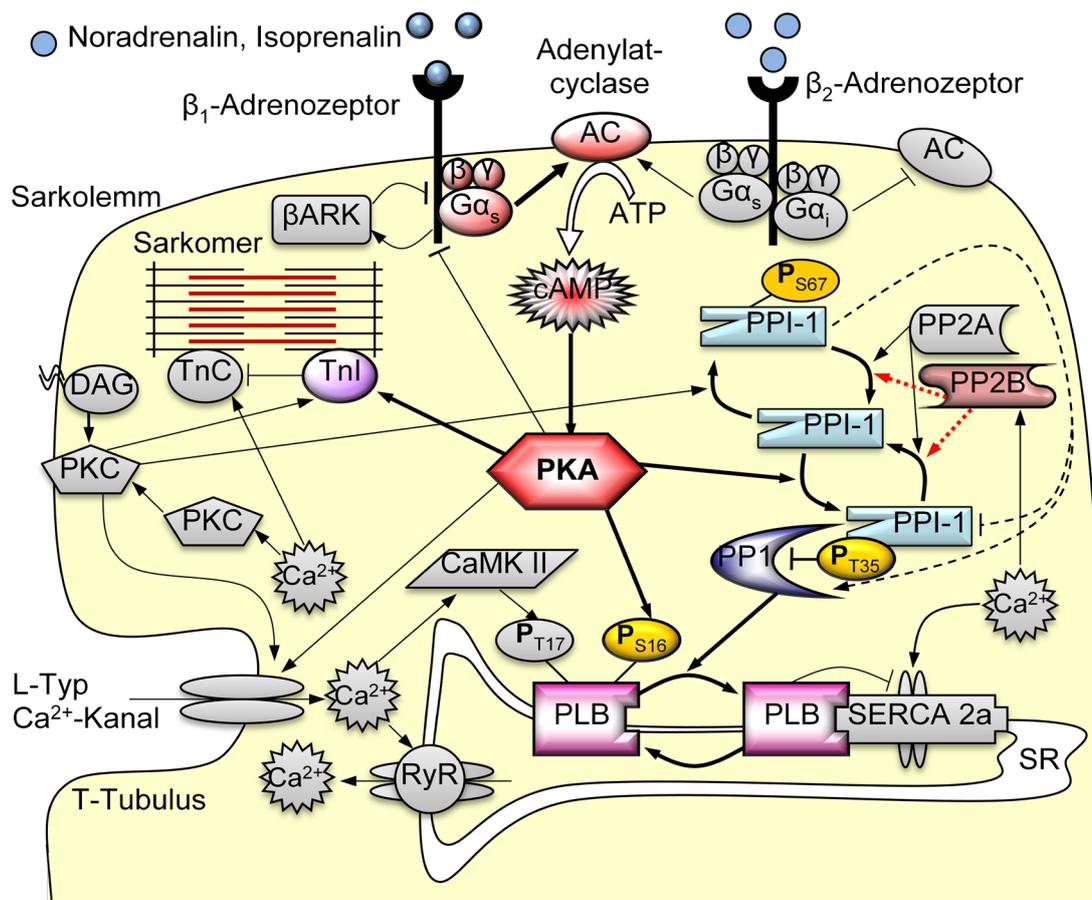


Abb. 1.1 Schema der β -adrenergen Signalkaskade in Kardiomyozyten

β ARK entspricht der β -Adrenorezeptorkinase; $G_{\alpha s/i}$, α - Untereinheit des stimulierenden/inhibierenden G-Proteins; PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase; PP1/2A/2B, Proteinphosphatase-1/2A/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, Diacylglyzerin; TnI/C, TroponinI/C; P, Phosphorylierung an der angegebenen Aminosäure. Übersichten dazu bei (Cohen 1989; Hajjar 1998; Rapundalo 1998; Post 1999; Steinberg 1999; Jalili 1999; Bers 2001; Bers 2002; Maier 2002; Rockman 2002; MacLennan 2003; Lohse 2003; Saucerman 2003; Keys 2004; Dorn 2004; Braz 2004; van der Heyden 2005; Yano 2005). Die gestrichelte Linie weist auf kontrovers diskutierte Signalwege hin.

1.2.2 Veränderungen der β -adrenergen Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz

In der chronischen Herzinsuffizienz kommt es auf Grund des erhöhten Sympathikotonus zu einer erhöhten Katecholaminfreisetzung (Hasking 1986), mit der Folge einer dauerhaften Stimulation von Adrenozeptoren. Dies führt im weiteren Verlauf zu einer Abnahme der β_1 -Adrenozeptoren, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Bristow 1982; Böhm 1988). Die noch vorhandenen β_1 -Adrenozeptoren desensibilisieren. Die Ursache liegt wahrscheinlich in den *G-protein-coupled receptor kinases*, deren Aktivität in der Herzinsuffizienz erhöht ist (Ungerer 1993) und zu einer Abkopplung der Adenylylcyclase vom Rezeptor führen. Darüber hinaus kommt es früh zu einer gesteigerten Expression inhibitorischer G-Proteine (Feldmann 1988; Neumann 1988; Böhm 1990; Eschenhagen 1992) bei Herzinsuffizienz. Diese führen zu einem verminderten Ansprechen G_s gekoppelter Rezeptorsysteme (Böhm 1988; Donahue 2000; Janssen 2002; Rau 2003). Die β_2 -Adrenozeptoren sind im insuffizienten Herzen nicht herunterreguliert. Die Gründe hierfür sind noch unklar. Eine Erklärung könnte eine alternative Signalkaskade im Vergleich zu β_1 -Adrenozeptoren sein.

Das β_1 -adrenerge Signal wird über den cAMP/PKA Signalweg zu den Zielproteinen vermittelt. Von besonderem Interesse sind dabei Proteine, die für den intrazellulären Kalzium-Haushalt des Kardiomyozyten verantwortlich sind, da gezeigt werden konnte, dass bei Herzinsuffizienz Ca^{2+} langsamer in das SR zurücktransportiert wird. Dadurch steht für die nächste Herzaktion weniger Ca^{2+} zur Verfügung (Pieske 1995; Hasenfuss 1996; Münch 2000). Auch Phospholamban moduliert den intrazellulären Kalziumhaushalt und wird über PKA reguliert. Im insuffizienten Herzen ist Phospholamban auf transkriptioneller Ebene vermindert, während die Proteinmenge unverändert ist (Frank 2002; MacLennan 2003). Vielfach konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin¹⁶ vermindert ist (Schmidt 1999; Schwinger 1999), die Aktivität der für Phospholamban relevanten Phosphatase-1 jedoch verdoppelt ist (Neumann 1997). In verschiedenen Mausmodellen für Herzinsuffizienz (inklusive β_1 -Adrenozeptor überexprimierende Mäuse) führte der *Knock Out* (KO) von Phospholamban zur Normalisierung der Kontraktilität bzw. zu einer Besserung (del Monte 1999; Hoshijama 2002; Engelhardt 2004). Die Modulation von Phospholamban ist daher möglicherweise ein neuer therapeutischer Ansatz. Aber die Übertragbarkeit auf den Menschen wurde in Frage gestellt, da der komplette Funktionsverlust von Phospholamban zu einer bereits im jugendlichen Alter letalen dilatativen Kardiomyopathie führt (Haghighi 2003).

Die PKA beeinflusst die Ca^{2+} Homöostase noch über andere Wege. Durch eine PKA vermittelte Phosphorylierung von L-Typ Kalziumkanälen wird eine Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR durch den Ryanodinrezeptor moduliert (Bers 2002). Widersprüchliche Ergebnisse gibt es über die Rolle des Ryanodinrezeptors bei Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass dieser in der Herzinsuffizienz durch die PKA hyperphosphoryliert wird und die Öffnungswahrscheinlichkeit dadurch steigt. Diese Erkenntnis führte zu der Annahme, dass dadurch die Kalziumkonzentration im SR weiter vermindert wird und dies somit ein wichtiger Baustein in der Pathogenese der Herzinsuffizienz ist (Marx 2000). Andere Gruppen hingegen haben diesen Ergebnissen widersprochen (Jiang 2002) und führten die PKA-abhängige Erhöhung der Ca^{2+} Freisetzung aus dem SR auf eine Modulation über Phospholamban zurück. Auf Grund der funktionellen Imbalance der Ca^{2+} beeinflussenden Signalwege, die eine Erhöhung oder Verminderung des diastolischen Kalziums bedingen, könnte ein erhöhtes zytosolisches Kalzium eine gemeinsame Endstrecke dieser Signalwege darstellen (Frey 2000).

All diese Veränderungen führen zu einer Desensitivierung des β -adrenergen Systems. Funktionell bedeutet dies, dass die kontraktile Reserve vermindert ist. Diese Änderungen in der Herzinsuffizienz können unterschiedlich ausgelegt werden. Zum einen kann dieser Mechanismus als positiv eingeschätzt werden, da er das Herz vor den negativen Folgen der chronischen β_1 -adrenergen Rezeptorstimulation, einschließlich Arrhythmien, Hypertrophie, Energiedysbalance und Apoptose, schützt. Zum anderen kann es zu einer weiteren Progression der Herzinsuffizienz führen. Abhängig hiervon können zwei verschiedene therapeutische Strategien verfolgt werden: Wiederherstellung der Empfindlichkeit oder weitere Hemmung des β -adrenergen Rezeptorsystems. Dies zeigt die vielen offenen Fragen in der β -adrenergen Signaltransduktion und ihrer Desensitivierung in der Herzinsuffizienz.

1.2.3 Die Serin/Threonin Proteinphosphatasen

Im Folgenden wird zur vereinfachten Darstellung anstatt von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen von Phosphatasen gesprochen. Phosphatasen sind für die intrazelluläre Signalvermittlung unerlässlich, da diese die Phosphorylierung von Aminosäuren (meist Serin, Threonin und Tyrosin) durch Proteinkinasen rückgängig machen. Anhand der Stimulierbarkeit durch verschiedene Co-Faktoren, ihrer Substratspezifität sowie ihrer Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren werden Phosphatasen eingeteilt in Phosphatase-1, 2A, 2B (Calcineurin) und 2C (Cohen 89; Shenolikar und Nairn 91; Herzig und Neumann 2000). In letzter Zeit wurden noch weitere Phosphatasen beschrieben, deren kardiale Bedeutung noch ungeklärt ist (Cohen 1997,

Herzig und Neumann 2000). Phosphatase-1 und die Phosphatase-2A machen mit 90% den Großteil der Phosphatasen im Herzen aus (Cohen 1989). Phosphatase-1 ist durch den Inhibitor-1 und den Inhibitor-2 hemmbar. Die Phosphatase-2 lässt sich durch unterschiedliche Kationen in der katalytischen Wirkung beeinflussen und wird hierdurch in weitere Gruppen unterteilt. Die Phosphatase-2A ist unabhängig von Kationen, wohingegen Calcineurin vollständig abhängig von Ca^{2+} und die Phosphatase-2C von Mg^{2+} ist (Herzig und Neumann 2000). Die Phosphatasen sind aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten zusammengesetzt. Die regulatorischen Einheiten beeinflussen die katalytische Einheit in ihrer Aktivität und Substratspezifität (Hubberd und Cohen 1993; Herzig und Neumann 2000).

Die Phosphatase-1 ist die vorwiegend im Herzen vorkommende Phosphatase (90%; MacDougall 1991; Steenaart, 1992; Neumann 1997). Sie ist ein 37 kDa schweres Protein und es sind vier verschiedene Isoformen der Phosphatase-1 bekannt, Phosphatase-1 α , Phosphatase-1 β/δ , Phosphatase-1 γ mit zwei *splice* Varianten Phosphatase-1 γ_1 und Phosphatase-1 γ_2 (Sasaki 1993), die von 3 Genen codiert werden. Die ubiquitär vorkommende Phosphatase-1 ist für multiple zelluläre Prozesse verantwortlich, wie z.B. Regulation der Ca^{2+} -Homöostase, Kohlenhydratmetabolismus und neuronale Signaltransduktion (Cohen 2002; Bollen 2004). Diese Funktionsvielfalt wird durch die Interaktion der katalytischen Untereinheit (Phosphatase-1c) mit verschiedenen regulatorischen Untereinheiten erreicht (Cohen 2002; Bollen 2004). Als Erkennungssequenz für die Interaktion von regulatorischer und katalytischer Untereinheit wurden 4-5 Aminosäuren (AS) identifiziert, wovon das hoch konservierte Aminosäuremotiv RVxF das häufigste ist. Die hauptsächliche Lokalisation der Phosphatase-1 im Herzen ist am SR. Verantwortlich hierfür ist möglicherweise die regulatorische Untereinheit G_m , die die Phosphatase-1 an die transmembranäre Domäne von Phospholamban im SR bindet (Johnson 1996; Berrebi-Bertrand 1998). Für die verschiedenen Funktionen der Phosphatase-1 sind weitere regulatorische Untereinheiten bekannt (z.B. myosinbindende M110-133 (Johnson 1996); die regulatorischen Proteine mit dem nukleären Inhibitor NIPP-1 (Buellens 1999), der nukleären Untereinheit PNUTS (Kim 2003). Die regulatorische Untereinheit Spiniophilin (Sato 1998) bindet Phosphatase-1c an den RyR (Marx 2001). Dieser Komplex besteht aus Ryanodinrezeptor, PKA, Phosphatase-1 und Phosphatase-2A. Die Regulation des Ryanodinrezeptors durch die Proteinphosphatasen führt zur Modulation der Ca^{2+} Freisetzung und damit zur Beeinflussung der elektromechanischen Kopplung im Herzen (Marx 2000).

In der Herzinsuffizienz ist die Aktivität der Phosphatasen deutlich erhöht, was vor allem der Phospholamban assoziierten Phosphatase-1c, zugesprochen wird (Neumann 1997; Mishra 2002; Gupta 2003). Die globale Proteinmenge ist aber nicht verändert (Neumann 1997). Ebenfalls wurde in Tiermodellen bei chronischer Stimulation mit dem β -Adrenozeptor Agonisten Isoprenalin eine verminderte Phospholamban-Serin¹⁶-Phosphorylierung und folglich eine verminderte kontraktile Antwort gefunden (Boknik 2000; Carr 2002). In Untersuchungen mit Okadasäure (Cohen 1990), welche die Phosphatase-1 und 2A hemmt, konnte die Phosphatase-1 gehemmt und die kontraktile Antwort aus insuffizienten Herzen wieder hergestellt werden (Neumann 2000). Die Überexpression von Phosphatase-1c_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 eine erhöhte Mortalität. Damit einhergehend wurde eine verminderte SERCA2a Konzentration und eine erheblich reduzierte Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung gefunden (Carr 2002). Die Dysregulation des Calcium Transports im SR trägt nicht nur zur verminderten Kontraktilität, sondern durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration auch zur Induktion und Progression der kardialen Hypertrophie bei (Hasenfuss 2002). Somit kann angenommen werden, dass bei diesem Prozess die Phosphatase-1 eine wichtige Rolle einnimmt (Carr 2002).

Das zytoplasmatische Ca²⁺-Calmodulin abhängige Calcineurin besteht aus einer regulatorischen kalziumsensiblen und einer katalytischen Untereinheit. Sie dephosphoryliert im Herzen den Transkriptionsfaktor "Nuclear factor of activated T cells" NFAT (Rao 1997). Dieser kann dadurch in den Zellkern diffundieren (Shibasaki 1996) und synergistisch mit GATA₄ die Genexpression (Luo 1996; Molkenin 2000) beeinflussen. In hypertrophierten Herzen ist eine Steigerung der Aktivität von Calcineurin nachzuweisen, die in insuffizienten Herzen weniger ausgeprägt ist (Haq 2001). Es gibt Hinweise auf eine Ca²⁺-abhängige Regulation der SERCA (Münch 2002) und somit einer Beeinflussung der Ca²⁺ Homöostase.

1.2.4 Der Proteinphosphataseinhibitor-1 (Inhibitor-1)

Auf Grund der Bedeutung der Phosphatasen im Herzen ist deren Regulation ebenfalls von Bedeutung. Die Regulation wird über inhibitorische Proteine wie Inhibitor-1, Inhibitor-2, dem nukleären Inhibitor (NIPP-1) und dem Dopamin und cAMP regulierte Phosphoprotein-32 (DARPP-32) erreicht (Herzig und Neumann 2000). Auf Grund der Erkenntnis, dass die Phosphorylierung der Phosphatase-1 in der Herzinsuffizienz ansteigt (Neumann 2002), richtete sich unser Interesse auf den Inhibitor-1. Der Inhibitor-1 wurde

erstmalig 1976 als Phosphorylase Phosphatase Inhibitor in der Skelettmuskulatur von Kaninchen beschrieben (Huang 1976). Es handelt sich um ein kleines zytosolisches Protein, welches hochspezifisch die Phosphatase-1 hemmt (Iyer 1988). Inhibitor-1 ist in verschiedenen Geweben von Säugetieren exprimiert, die höchsten Konzentrationen wurden im Gehirn, Skelettmuskel, Fettgewebe und den Nieren gefunden (MacDougall 1989; Gustafson 1991; Hemmings 1992; Alder 1995; Lowenstein 1995), aber auch im Herzen konnte Inhibitor-1 nachgewiesen werden (Neumann 1991; Gupta 1996). Inhibitor-1 ist sehr stabil gegenüber Hitze, Säure, organischen Lösungsmitteln und Detergenzien, reagiert aber labil gegenüber der Proteinase Trypsin (Huang 1976; Nimmo 1978; Folkes 1979). Inhibitor-1 besteht beim Kaninchen aus 165 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 18640 Da (Aitken 1982). In der Gelelektrophorese befindet sich die Bande auf einer Höhe von 26 kDa (Nimmo 1982). Der Unterschied ist wohl auf die geringe Detergenzienbindung (Aitken 1982), die eher randomisiert-spiralige Form des Proteins und einen großen Stoke'schen Radius (Cohen 1988) zurückzuführen. Inhibitor-1 in der Ratte besteht aus 171 Aminosäuren (MacDougall 1989) und die Bande befindet sich in der Gelelektrophorese bei 30 kDa. Dennoch besteht eine 80% Homologie der gesamten Sequenz und 98% der N-terminalen 61 Aminosäuren. Die N-terminalen 54-66 Aminosäuren verkörpern die kürzeste aktive Untereinheit des Inhibitor-1 (Elbrecht 1990; Endo 1996). Darin liegt das Phosphatase-1 Bindungsmotiv und Threonin³⁵ (Egloff 1997), welches PKA abhängig phosphoryliert wird und somit Inhibitor-1 aktiviert (Cohen 1977). Inhibitor-1 bindet sowohl im un- als auch im phosphorylierten Zustand an Phosphatase-1. Der Unterschied besteht in der Dissoziationsgeschwindigkeit, die bei phosphoryliertem Inhibitor-1 nur halb so schnell ist.

Nach der Entdeckung von Inhibitor-1 wurde zunächst seine Rolle im Glykogenmetabolismus der Leber und Skelettmuskulatur untersucht (Cohen and Cohen 1989). Es wurde gezeigt, dass die PKA den Inhibitor-1 aktiviert und dadurch den Adrenalin induzierten Glykogenabbau bzw. die Inhibierung der Glykogensynthese vermittelt (Cohen 1977; Foulkes 1980). Dies wurde jedoch durch die überraschenden Ergebnisse bei Inhibitor-1/DARPP-32 Doppel-KO-Mäusen (Scrimgeour 1999) wieder in Frage gestellt, bei denen es weder nach Stimulation mit Adrenalin oder Insulin zu einer Beeinflussung der Glykogensynthese-Aktivität kommt. Eine weitere wichtige Rolle übernimmt Inhibitor-1 im Gehirn bei der Langzeitdepression (LTD) der Aktivität von Neuronen, der eine besondere Rolle bei Lernen und Gedächtnis zukommen soll. Hierbei wird Inhibitor-1 durch Calcineurin dephosphoryliert und dadurch die Phosphatase-1 Aktivität erhöht (Allen 2000; Genoux 2002). Ebenfalls konnte Inhibitor-1 in der glatten Gefäßmuskulatur der Arterien nachgewiesen werden. Deren Calciumsensitivität wird von

Phosphatasen reguliert, wodurch ein möglicher Einfluss von Inhibitor-1 postuliert wurde. Die Überprüfung an Inhibitor-1 KO-Mäusen zeigte aber keinen Einfluss von Inhibitor-1 (Carr 2001).

Erste Hinweise einer möglichen Funktion von Inhibitor-1 im Herzen wurden von Neumann et al. beschrieben. Es wurde gezeigt, dass der Inhibitor-1 Isoprenalin-abhängig aktiviert wird und dadurch die Phosphatase-1 im Herzen hemmt (Neumann 1991). Der Inhibitor-1 wird *in vivo* nach β -adrenerger Stimulation (Foulkes 1979, Foulkes 1980; Kathra 1980) durch die Aktivierung der β_1 -Adrenozeptoren, G_s und der Adenylylcyclase mit folgender cAMP-Erhöhung und PKA Aktivierung (Steinberg 1999; Soucermann 2003; Xiang 2003) an Threonin³⁵ phosphoryliert (Aitken 1982). *In vitro* Experimente zeigten, dass Inhibitor-1 an Threonin³⁵ ebenfalls zeitabhängig, jedoch langsamer auch von der cGMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wird. Beide Proteinkinasen erreichen einen maximalen Einbau von etwa 0,75-1 Mol Phosphat/Mol Inhibitor-1 (Endo 1997; Tokui 2003). *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 Inhibitor-1 phosphoryliert vorgefunden (Aitken 1982). Die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C_α phosphoryliert Inhibitor-1 an zwei weiteren Stellen, dem Serin⁶⁷ (Braz 2004; Sahin 2006) und Threonin⁷⁵ (Rodriguez 2007). Die Phosphorylierung hat funktionell den gegensinnigen Effekt einer PKA-vermittelten Phosphorylierung und bewirkt über eine Abnahme der Inhibitor-1 Aktivität eine Zunahme der Phosphatase-1 Aktivität mit erniedrigter Phospholamban-Phosphorylierung (Braz 2004).

In Nierenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor-1 an der Threonin³⁵ Phosphorylierungsstelle durch die Phosphatase-2A, aber nicht durch Calcineurin dephosphoryliert wird (Higuchi 2000). In Neuronen wurde gezeigt, dass die Inhibitor-1-Threonin³⁵ Dephosphorylierung vorrangig auf Calcineurin zurückzuführen ist. Ob die PKA-Inhibitor-1-Threonin³⁵ Phosphorylierung durch das Ca^{2+} -aktivierte Calcineurin dephosphoryliert wird, ist im Herzen noch unklar.

1.3 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Der Proteinphosphataseinhibitor-1 (Inhibitor-1) wurde bereits 1991 im Herzen nachgewiesen. Dennoch war bisher über seine Funktion und Relevanz im Herzen nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen von Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz und den Einfluss von Calcineurin auf den Phosphorylierungsgrad von Inhibitor-1 zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten daher in dieser Promotionsarbeit untersucht werden:

1. Wie verhält sich die mRNA und Proteinkonzentration von Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz?
2. Verändert sich die Phosphorylierung von Inhibitor-1?
3. Welche weiteren Zielproteine der PKA sind in der menschlichen Herzinsuffizienz relevant und stehen diese in einem möglichen Zusammenhang mit Veränderungen von Inhibitor-1?
4. Beeinflusst die Hemmung von Calcineurin die Phosphorylierung von Inhibitor 1 und nachgeschalteter Phospho-Proteine?

2 Material und Methoden

Soweit nicht bereits im Text erwähnt sind alle verwendeten Materialien im Anhang unter Punkt 8 tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Menschliche Herzproben

Die menschlichen Herzproben wurden von Patienten, die sich im Rahmen einer schweren Herzerkrankung (dilatative Kardiomyopathie, DCM; ischämische Kardiomyopathie, ICM) einer Transplantation unterzogen haben, gewonnen. Die Ejektionsfraktion betrug 16-25%, der Herzindex lag bei 1,7–2,7 l/min x m² und die NYHA Klassifikation bei III–IV. Kontrollherzen sind Herzen, die auf Grund ungeeigneter Empfänger nicht transplantiert werden konnten (Details Tabelle 3.1 und 3.2). Für die Präparation wurde stets das Gewebe des linken Ventrikels verwendet. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Hamburg geprüft und genehmigt (Az. 532/116/9.7.1991)

2.2 Arbeitstechniken mit RNA

2.2.1 Gesamt-RNA-Präparation aus Gewebe

Die Gesamt-RNA wurde nach einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRIzol[®] (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. 200 mg tiefgefrorenes Herzmuskelgewebe (linksventrikuläres Gewebe von insuffizienten und nicht insuffizienten Patienten Tab. 3.1) wurde mit einem Porzellanmörser in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in ein vorgekühltes Potter-Gefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml TRIzol[®]. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei 1.000 rpm 7 x 20 s auf Eis gepottert. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min und eine anschließende Zugabe von 200 µl Chlorophorm. Anschließend wurden die Proben für 60 s gevortext und zur Phasenauftrennung 15 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Es erfolgte eine Trennung in drei Phasen: wässrige obere Phase (RNA), weiße dünne Interphase (DNA), rote phenolische untere Phase (Protein). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, zur RNA-Fällung mit dem gleichen Volumen an eisgekühlten Isopropanol versetzt und nach erneutem Schütteln für 10 min inkubiert. Schließlich wurde die RNA pelletiert (10 min, 4 °C, 12.000 g). Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen. Das Gefäß wurde kurz geschüttelt und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 12.000 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet, das Präzipitat in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 10 min bei 60 °C gelöst. Im Anschluss wurde die RNA zur Vermeidung von Ligationen auf Eis gestellt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bei einer

Wellenlänge von 260 nm fotometrisch ermittelt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 RNA Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte nach Sambrook (2001) in einem mit Formaldehyd denaturierenden 1% Agarosegel. Es wurde je Probe 20 µg RNA eingesetzt und mit zwei Volumen Denaturierungspuffer gemischt. Die Denaturierung erfolgte bei 70 °C für 5 min. Danach wurden die Proben, um eine Renaturierung zu verhindern, sofort auf Eis gekühlt und 1/10 Volumen Ladepuffer zugegeben. Nach einem Vorlauf von 10 min erfolgte die elektrophoretische Trennung der RNA bei einer Spannung von 80 V in 1 x MOPS-Puffer bis die Farbfront des Ladepuffers den unteren Gelrand erreicht hatte. Durch Betrachtung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele unter UV-Licht wurde die Qualität der RNA-Präparation überprüft.

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat 0,5% (V/V)
in bidest. Wasser gelöst
autokaviert

10 x MOPS

MOPS 20 mM
Natriumacetat 50 mM
Na-EDTA 5 mM
pH 7,0
autoklaviert

denat. Agarosegel (1%)

Agarose 1% (m/V)
Formaldehyd, säurefrei 2% (V/V)
Ethidiumbromid 0,5 µg/ml
in 1 x MOPS

Denaturierungspuffer

Formaldehyd, säurefrei 8,7% (V/V)
Formamid, deionisiert 63,3% (V/V)
in 1 x MOPS

Ladepuffer für RNA

Bromphenolblau-Lösung q. s.
DEPC-Wasser 50% (V/V)
Glycerol 50% (V/V)
autoklaviert

2.2.3 RNA Transfer

Durch Kapillartransfer wurde die zuvor aufgetrennte RNA in Hochsalzpuffer 10 x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) transferiert (Sambrook 1989). Der Transfer wurde für 16–24 h durchgeführt. Der Blot wurde wie folgt zusammengebaut, 2 x befeuchtetes Blotpapier, das Gel, die Membran, 2 x Blotpapier und ein Stapel saugfähiges

Papier. Der Transfer wurde durch Beschwerung mit einem Gewicht verbessert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 2 x SSC Puffer gewaschen. Anschließend wurde die RNA auf der noch feuchten Membran mittels Bestrahlung mit UV-Licht (1254 nm, Stratagene, Stratalinke) fixiert (*cross-linking*) und danach 20 min bei 80 °C aufbewahrt. Die Blots wurden bis zur Hybridisierung in einer Folie bei -20 °C gelagert.

10 x SSC

NaCl 1,5 M

tri-Natriumcitrat x 2H₂O 150 mM

pH 7,0

autoklaviert

2 x SSC

NaCl 300 mM

tri-Natriumcitrat x 2H₂O 30 mM

pH 7,0

2.2.4 Herstellung und Markierung radioaktiver Sonden

Als Matrizen-DNA für die Markierung einer PPI-1 cDNA-Sonde diente die codierende Sequenz der Ratte (640 bp). Zur Normalisierung der RNA Menge diente die cDNA eines 608 bp großen Fragmentes der menschlichen GAPDH.

2.2.5 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden nach der *random primed labeling*-Methode mit High-Prime-Lösung (Roche, Mannheim) hergestellt (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984). 50 ng Matrizen-DNA wurden bei 95 °C für 10 min denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Der Nukleotideinbau des α -[³²P]-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, NEN-Du Pont) erfolgt durch die Klenow-Polymerase, wobei Random-Hexamere als Primer dienten. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Reaktion wurden nicht eingebaute Radionukleotide über eine G25-Sephadexsäule (Amersham) abgetrennt. Diese wurde zunächst mit TE-Puffer äquilibriert und im Anschluss mit der zugegebenen Probe für 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Einbau der Radioaktivität durch Messung eines Aliquots im Szintillationszähler bestimmt.

Tris-EDTA (TE)-Puffer

10 mM TrisTris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,0

1 mM EDTA

2.2.6 Hybridisierung und Autoradiographie

Zunächst musste die Membran mit dem Hybridisierungspuffer für mindestens 4 h bei 42 °C in einem Rollinkubator prähybridisiert werden. Die radioaktiv markierte Sonde wurde anschließend für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Zur Hybridisierung wurde die Sonde zur Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht erfolgte die Hybridisierung. Die hybridisierte Membran wurde mit 2 x SSC Puffer, mit 2 x SSC + 0.1% (m/V) SDS bei 60 °C gewaschen, sowie mit 0,2 x SSC + 0,1% (m/V) SDS bei 60 °C und abschließend mit 0,2 x SSC ohne SDS bei RT für je 15 min gewaschen. Die Membranen wurden feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Phosphor-Imager[®]-Kassette für ca. 24 h bei -80 °C exponiert. Für weitere Hybridisierungen wurde die radioaktiv markierte Sonde durch eine 30 min Inkubation der Membran mit kochender 0,1% SDS-Lösung entfernt.

Prähybridisierungslösung

Formamid, deionisiert 50,0% (V/V)

NaCl 0,9 M

NaH₂PO₄ x H₂O 50 mM

NaEDTA 5 mM

SDS 0,2% (m/V)

Rinderserumalbumin 0,1% (m/V)

Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon) 0,1% (m/V)

Ficoll 400 0,1% (m/V)

pH 7.4

2 x SSC + 0.1% SDS

NaCl 300 mM

tri-Natriumcitrat x 2H₂O 30 mM

SDS 0,1% (m/V)

pH 7,0

0,2 x SSC + 0,1% SDS

NaCl 30,0 mM

tri-Natriumcitrat x 2H₂O 3,0 mM

SDS 0,1% (m/V)

pH 7.0

Ethidiumbromid 1% in H₂O

2.3 Arbeitstechniken mit DNA

2.3.1 Allgemeine Techniken

2.3.1.1 Herstellung elektrisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation von DNA in *E. coli* mussten die Bakterienzellen vorab kompetent, d. h. für DNA aufnahmefähig gemacht werden. Elektrokompetente Zellen wurden nach der Methode von Dower et al. (1988) hergestellt. Es wurden die *E. coli*-Stämme BL21 und DH10B verwendet. 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz wurden mit 40 µl *E. coli*-Glycerinkultur angeimpft und im Schüttelinkubator über Nacht angezogen (37 °C, 180 rpm). Mit der Vorkultur wurde ein Liter LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis die OD₅₇₈ 0,6-0,8 betrug. Die Kultur wurde für eine Stunde auf Eis gestellt und anschließend bei 1.400 x g für 10 min (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in 100 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. 19 ml Waschpuffer wurden abgenommen und die Zellen in dem verbliebenen Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren bzw. direkt verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Bakterienzellen

Bis zu 1,0 µg salzfreie DNA wurden mit 40 µl elektrokompetenten *E. coli* gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Gene Pulser[®]-Küvette, Biorad). Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer (Gene Pulser[®], Biorad) bei 2.500 V, 200 Ω und 25 µF. Zu dem elektroporierten Ansatz wurden sofort 150 µl SOC-Medium gegeben. Die Zellen wurden aus den Küvetten in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 37 °C für 60 min geschüttelt (Thermomixer). Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten, die das Antibiotikum des Resistenzgens enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert.

Luria Broth (LB) Agarplatten

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

ad 500 ml USF-Wasser. 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 falls notwendig Kanamycin oder Ampicillin zugeben 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	
autoklaviert	

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 <i>Aqua ad iniectabilia</i>	

2.3.1.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonucleasen (Tabelle 2.1) wurden nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Die Hauptbezugsquelle für Restriktionsendonucleasen war New England Biolabs (Frankfurt am Main).

Tabelle 2.1

Restriktions- endonucleasen	Sequenz	Puffer	10 x BSA	Enzymanteil
Kpn I	5' GGTAC/C 3' 3' C/CATGG 5'	1	ja	10%
PST 1	5' CTGCA/G 3' 3' G/ACGTC 5'	3	ja	10%
Xba I	5' T/CTAGA 3' 3' AGATC/T 5'	2	ja	5%
Eco R1	5' G/AATTC 3' 3' CTTAA/G 5'	4, 1, 2 oder 3	nein	5%

Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden

Vektoren wurden vor der Verwendung erst mit einem Enzym linearisiert. Es entstanden kompatible Enden. Um eine Religation zu verhindern, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden der Vektor-DNA, welche für die Ligation benötigt wurden, mit alkalischer

Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Die Möglichkeit der Ligation von Vektor und einzuklonierendem DNA-Fragment blieb jedoch weiterhin bestehen, da das Fragment noch beide Phosphatreste trug. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgte mit einer Einheit CIP (Roche, Mannheim) pro 7,5 µg DNA in 1 x CIP-Puffer für 30 min bei 37 °C. Die CIP wurde für 15 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Zur sicheren Entfernung der CIP wurde die dephosphorylierte DNA zusätzlich über ein DNA-Agarosegel gereinigt.

Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurde die native Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Agarosekonzentration war abhängig von der Größe der zu erwartenden Fragmente, sie lag zwischen 2% für kleine und 0,5% für große Fragmente. Die Agarose wurde in TAE-Puffer erhitzt und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer. Die Aufreinigung von cDNA erfolgte mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg).

2.3.2 Herstellung der cDNA für die Northern Blot Sonde

2.3.2.1 Inhibitor-1 cDNA-Synthese

Gesamt-RNA (2.2.1) aus dem linken Ventrikel menschlicher Herzen (für Inhibitor-1) wurde in einer reversen Transkription mit Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Nach der Gehaltsbestimmung der RNA wurden 4 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit *Aqua ad iniectabilia* auf 11 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von je 1 µl Random Primer (p(dN)₆, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde zum Denaturieren für 5 Minuten bei 94 °C inkubiert. Nach kurzem „Abschrecken“ auf Eis wurde der Reaktionsmix zugegeben. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert und anschließend die reverse Transkriptase durch erneute Inkubation bei 94 °C für 5 min inaktiviert. Nach erneutem „Abschrecken“ auf Eis wurde die durch die reverse Transkription erhaltene cDNA mit *Aqua ad iniectabilia* auf 60 µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Reaktionsmix

5x First Strand buffer (Invitrogen)	4 µl
dNTP-Mix (10 mmol/l, Peqlab)	2 µl
DTT (0,1 mol/l, Invitrogen)	1 µl
M-MLV reverse Transkriptase (Invitrogen)	1 µl

2.3.2.2 Vermehrung und Separation der cDNA

Folgender Ansatz und Temperaturbedingungen wurden gewählt.

10 facher PCR Puffer II	10 µl
MgCl ₂ (25 mmol)	12 µl
dNTP	2 µl
Primer, vorwärts	200 pmol
Primer, rückwärts	200 pmol
RT-Produkt	4 µl
DNA Polymerase	0,5 µl
ad. 100 µl Aqua ad iniectabilia.	

PCR Temperaturbedingungen für GeneAmp® PCR System 9700

Sequentierungs 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

Verwendeter Primer

Primer	Sequenz
Mensch Inhibitor-1, vorwärts	5' gcc atg gag caa gac aac a 3'
Mensch Inhibitor-1, rückwärts	5' cct ctc tca gac cga gtt gg 3'

Die amplifizierte Inhibitor-1 DNA wurde über ein präparatives 0,5% Agarose-Gel separiert. In ein elektrisches Feld gebracht, wandern die negativ geladenen DNA Stücke im Gel zur Anode und trennen sich nach ihrer Größe auf. Das, den Agarose-Gelen beigefügte, Fluorochrom Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren. Unter UV-Licht leuchtet diese Bande, kann somit ausgeschnitten und die DNA so extrahiert werden. Zur amplifizierten DNA wurden 20% DNA Ladebuffer gegeben. Dieser Ansatz wurde neben einem Größtandard (peqGold 1 kb DNA-Leiter, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) auf ein 0,5% Agarose/small DNA-Agarose Gel mit präparativem Kamm geladen. Das Gel wurde mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-(Tris)-Azetat-EDTA-Laufpuffer (TAE) in *Mini-Sub-Cell* Elektrophorese-Kammer unter Spannung gelegt. Die

Laufzeit betrug bei 55 V etwa 1-1,5 h. Sobald die Inhibitor-1 Bande deutlich von den kurzen Primern getrennt war, wurde die bei 640 bp liegende Inhibitor-1 Bande am UV-Transluminator ausgeschnitten und die DNA mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) aufgereinigt.

Tris-Azetat-EDTA (TAE) Puffer

Tris	4,84 g
Na ₂ EDTA (H ₂ O) ₂	0,744 g
Azetat	1142 µl
<i>Aqua ad iniectionabilia</i> ad 1 l,	
pH 8,5	

6xDNA Ladepuffer :

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Glycerin	30%
EDTA	50 mM

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid in 1 ml *Aqua ad iniectionabilia* lösen
vor Gebrauch 1:10 verdünnen

0,5% Agarose/small DNA-Agarose Gel

0,25 g small DNA Agarose und 0,25 g Universal Agarose wurde in 100 ml TAE in der Mikrowelle aufgekocht, unter rühren auf Handwärme abgekühlt und 20 µl verdünnte Ethidiumbromidlösung zugeben. Anschließend wurde die Lösung blasenfrei in einen Gelhalter mit Probenkamm gegossen und 20-30 min zum Aushärten stehen gelassen.

2.3.3 Herstellung des rekombinanten Inhibitor-1 Proteins

Das rekombinante Protein wurde über eine Proteinfusionsstrategie hergestellt, indem die cDNA Sequenz von Inhibitor-1 an die DNA Sequenz eines *Carrier* Proteins (GST) angehängt wurde. Das Fusionsprotein akkumuliert im Zytoplasma. Aufgereinigt wurde das rekombinante Protein anschließend über Affinitätschromatographie. Hierbei bindet das GST an Gluthation, einem Liganden der an Sepharose gekoppelt ist. Die Eluierung des rekombinanten Proteins erfolgt mit Hilfe einer spezifischen Protease (Thrombin), deren Erkennungssequenz zwischen beiden Proteinteilen liegt. Um ein Fusionsprotein herzustellen wurde ein Vektor (pGEX 1λT) benötigt, in welchen das DNA-Fragment in die *Multiple Cloning Site* einkloniert werden konnte. Der Vektor enthält neben der GST-Sequenz auch die Sequenz für die Thrombinschnittstelle. Der Vektor besitzt einen *tac* Promotor der durch Isopropyl β-D Thiogalactosid (IPTG) induziert und somit die Expression des Fusionsproteins kontrolliert. Der *tac* Promotor selbst wird durch das *lacIq* Genprodukt (Sequenz im Vektor vorhanden, Repressorprotein), welches an die Operator Region bindet, unterdrückt, bis es zu einer Induktion mit IPTG kommt.

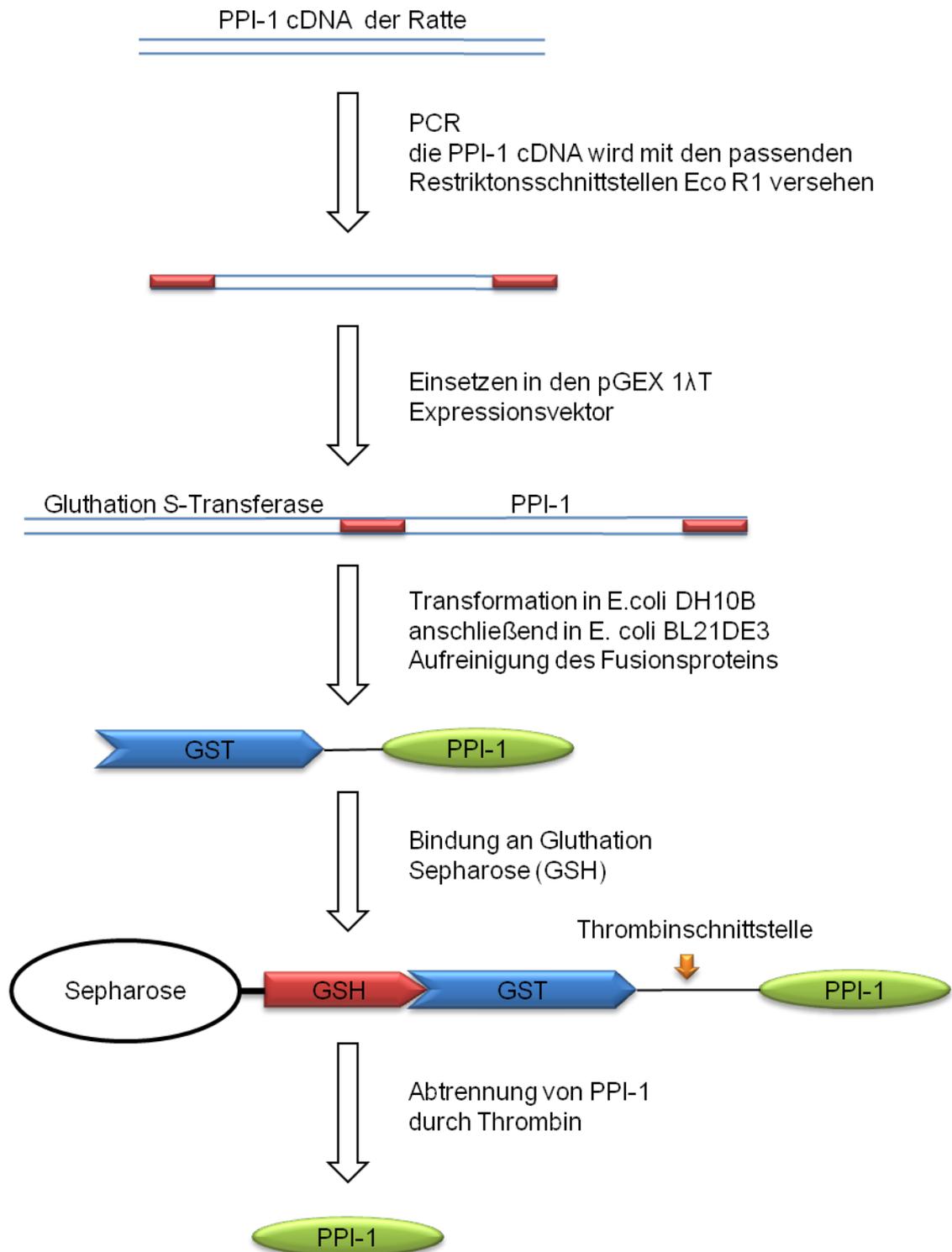


Abb. 2.1 Schema zur Herstellung und Aufreinigung von Inhibitor-1 (PPI-1)

2.3.3.1 Herstellung der Inhibitor-1 cDNA

Zur Herstellung des rekombinanten Inhibitor-1 GST-Fusionsproteins der Ratte wurde die Inhibitor-1 DNA der Ratte aus einem Plasmid (pSKAC) isoliert. Zur Isolierung der DNA wurden 5 µg des Plasmids ad. 10 µl *Aqua ad iniectabilia* mit Xba I und Kpn I verdaut. Nach dem Verdau wurden zum Reaktionsmix 20% DNA Ladepuffer gegeben, über ein präparatives Gel separiert und die Konzentration bestimmt. Anschließend wurde die Inhibitor-1 DNA mit Hilfe der PCR vermehrt.

PCR Reaktionsansatz

10 facher PCR Puffer II 10 µl

MgCl₂ (25 mmol) 12 µl

dNTP 2 µl

Primer, vorwärts 200 pmol

5' aag ctt gaa ttc gag ccc gac aac agt cca 3'

Primer, rückwärts 200 pmol

5' cgc aga att ctc aga cca agc tgg ctc ctt g 3'

cDNA Inhibitor-1

DNA Polymerase 0,5 µl

ad 100 µl *Aqua ad iniectabilia*.

Tabelle 2.2

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

Die cDNA wurde auf ein präparatives Gel aufgetragen, isoliert und die Konzentration bestimmt.

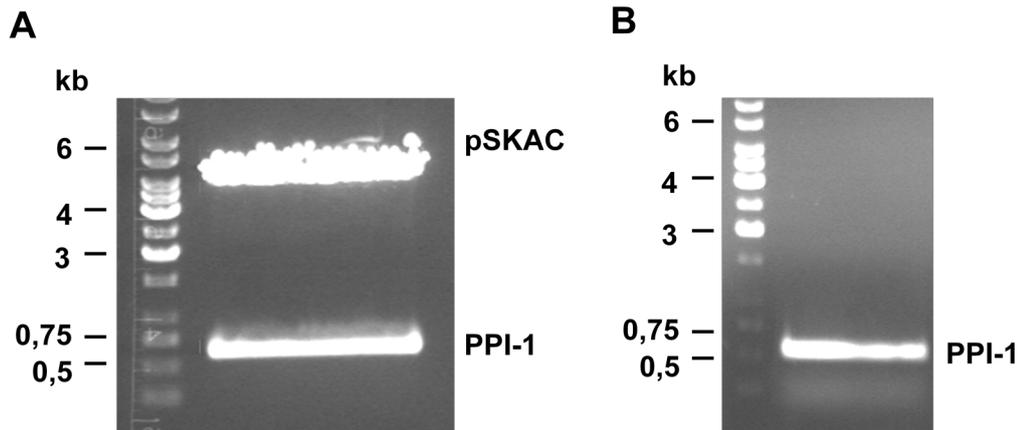


Abb. 2.2: Klonierung des Inhibitor-1 (PPI-1) Konstruktes

A Isolation der cDNA von Inhibitor-1 mittels Xba 1 und Kpn 1 aus dem pSKAC Vektor
Die DNA von Inhibitor-1 ist bei 620 bp zu erkennen, während bei etwa 6 Kilobasen das Plasmid pSKAC zu finden ist.

B Inhibitor-1 cDNA Amplifikation mittels PCR

2.3.3.2 Linearisierung des Expressionsvektors

Als Expressionsvektor wurde ein Plasmid (pGEX 1 λ T, Amersham, Abb. 2.3) verwendet. Zur Linearisierung wurden 5 μ g des Plasmids mit Eco R1 verdaut. Für einen Verdau wurden zu der DNA 20 μ l *Aqua ad iniectabilia* 10% Puffer sowie je 5% Enzym gegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und bei 37 °C zwei Stunden inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Vektorenden mit CIP dephosphoryliert und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde mit dem GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) aufgereinigt und anschließend die Konzentration bestimmt.

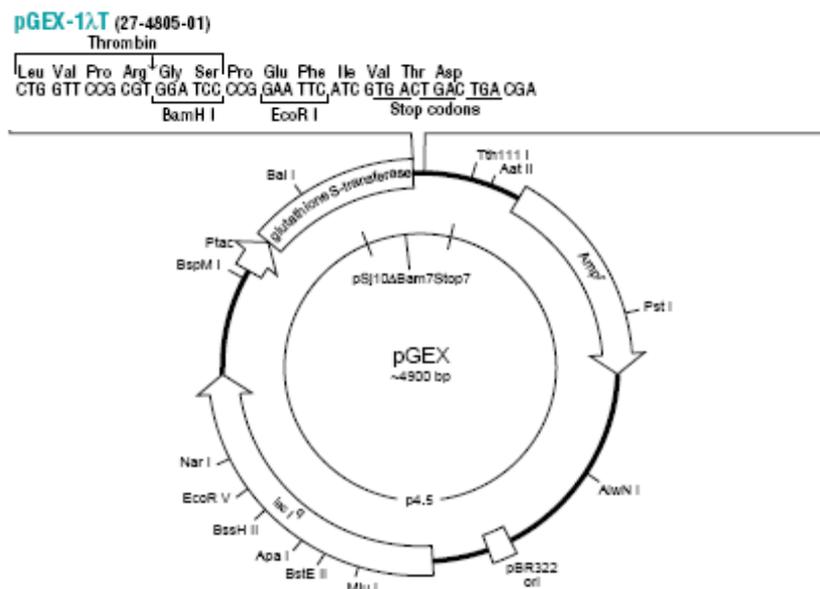


Abb. 2.3 Expressionsvektor pGEX 1 λ T

2.3.3.3 Restriktionsverdau der Inhibitor-1 cDNA und Ligation mit dem pGEX Vektor

Um das Inhibitor-1 cDNA Fragment in den pGEX Vektor zu klonieren, wurden 8 µg Inhibitor-1 cDNA mit Eco R1 geschnitten.

Restriktionsschnittansatz

Inhibitor-1 cDNA	40 µl
Puffer für Eco R1 (10x)	5 µl
Eco R1	1 µl

ad 50 µl *Aqua ad iniectabilia*

Nach 2 h Verdau bei 37 °C wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, eluiert und die Konzentration bestimmt.

Für die Ligation von linearisiertem Plasmid und Inhibitor-1 cDNA wurde T4 DNA Ligase verwendet, die die Phosphodiester-Bindungen zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxylende katalysiert, sofern im Reaktionsansatz 1 mM ATP vorhanden ist. Das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor und einzubauendem DNA-Fragment betrug 1:5. Anschließend wurde die DNA mit Glykogen bei -20 °C gefällt, mit Ethanol gewaschen, getrocknet, in *Aqua ad iniectabilia* aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Zur Ligation wurden 600 ng Inhibitor-1 cDNA mit geschnittenem pGEX 1λT gemischt und 10 x T4 DNA Ligase Puffer (mit 10 mM ATP, New England BioLabs, Frankfurt am Main) und T4 DNA Ligase (400.000 units/ml, New England BioLabs, Frankfurt am Main) versetzt und 3 h bei RT inkubiert.

2.3.3.4 Transformation des Ligationsansatzes in elektokompetente *E. coli* DH10B

0,5 µg linearisierter Ligationsansatz (pGEX Vektor und Inhibitor-1 cDNA) wurde in kompetente *E. coli* DH10B zur Rekombination transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampizillin Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.5 Plasmidisolation

Am nächsten Tag wurden 20 Kolonien gepickt und in je 5 ml LB Medium mit Ampizillin bei 37 °C und 150 rpm vermehrt. Die Konzentration der Bakteriensuspensionen erfolgte durch zentrifugieren bei 12.000 rpm für 30 sec und Verwerfen des Überstandes. Vor der Zentrifugation wurden 500 µl abgenommen. Das Plasmid wurde mit dem Machery Nagel Kit zur Plasmidisolierung (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) aus dem Pellet eluiert, und die Konzentration bestimmt.

2.3.3.6 Restriktionsverdau und Sequenzierung

Es wurde nun kontrolliert, ob sich das richtige Fragment im pGEX Vektor befindet und ob die Orientierung des Inserts stimmt. Dies wurde mit EcoR1 und PST1 (2.3.1.3) überprüft. Um sicherzustellen, dass die Sequenz des Inserts 100% mit der ursprünglichen Sequenz des Inhibitor-1 Gens übereinstimmt, wurden anschließend positive Klone sequenziert.

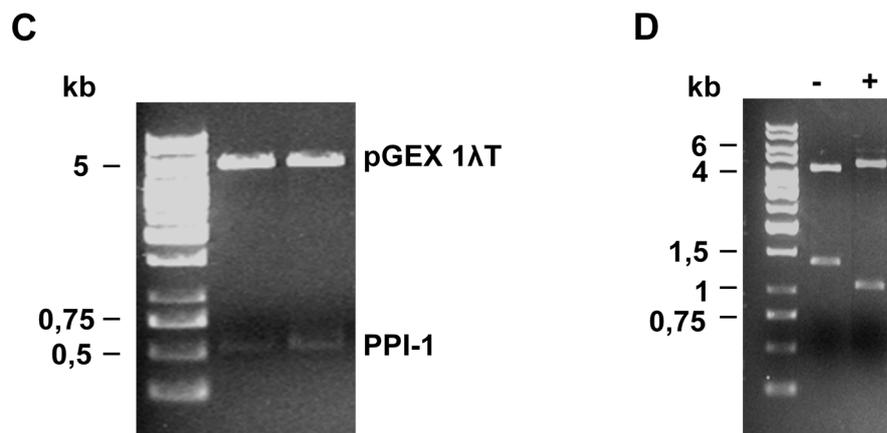


Abb. 2.2

C Die positive Ligation von Inhibitor-1 in pGEX 1λT lässt sich durch ECO R1 in zwei DNA-Fragmente mit einer Länge von 4950 und 620 schneiden

D Die Richtung der positiven Ligation von Inhibitor-1 in pGEX 1λT wurde durch PST 1 überprüft. Die DNA zerfällt in zwei DNA-Fragmente. Bei falscher Richtung ergaben sich die Fragmente 3600 bp und 1350 bp (-) und bei richtiger Richtung waren es die Fragmente 3800 bp und 1150 bp (+)

Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurde eine PCR mit einem Sequenzierkit durchgeführt und die DNA anschließend gefällt. Die Sequenzierung wurde vom Institut für Biochemie der Universität Erlangen übernommen. Auf Eis wurden pro Ansatz 200-1000 ng DNA ad 15 µl *Aqua ad iniectabilia*, 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 4 µl Sequenziermix gemischt und folgende Primersequenz verwendet:

Ratte Inhibitor-1, vorwärts mit EcoR1 5' aag ctt gaa ttc gag ccc gac aac agt cca 3'

Ratte Inhibitor-1, rückwärts mit EcoR1 5' cgc aga att ctc aga cca agc tgg ctc ctt g 3'

Die Ansätze wurden mit Silikonöl überschichtet und nach folgendem Schema amplifiziert:

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 das Öl entfernt und der Ansatz gereinigt und die Probe zur Sequenzierung gegeben.

2.3.3.7 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Inhibitor-1 Proteins

Die Inhibitor-1-pGEX positiven *E.coli* BI21 wurden in 20 ml LB Medium mit Ampizillin bei 37 °C und 150 rpm über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurde mit der Bakteriensuspension in 1 l LB-Medium mit Ampizillin zur weiteren Vermehrung gegeben. Diese wuchsen weiter bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 0,6. Anschließend wurde mit 1 mM IPTG für 4 h induziert. Die OD_{578} betrug 1,6. Die Suspension wurde für 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 30 ml PBS aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Es wurde jeweils 1 ml Suspension vor und nach Induktion abgenommen und in ein 1,5 Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und das Pellet in 200 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Überprüfung der Stimulation wurde mit diesen beiden Homogenaten eine Elektrophorese durchgeführt und das Gel Coomassie gefärbt.

Die Bakteriensuspension wurde langsam auf Eis aufgetaut und mit einem Sonifikator 60 x 10 s mit jeweils 10 s Pause auf Eis sonifiziert. Unter dem Mikroskop durften nicht mehr als 10% intakte Bakterien vorhanden sein. Die Suspension wurde für 15 min bei 4 °C 14.000 rpm zentrifugiert, der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. 1 ml wurde anschließend abgenommen.

Zur Aufreinigung wurde eine 10 ml Säule (Biorad, München) verwendet, die mit 1.600 µl Gluthathion Sepharose (Amersham, Freiburg) beladen wurde. Diese wurde mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Säule bei 4 °C 5 x mit 28 ml sonifizierten Überstand beladen. Die Säule wurde 3 x mit 5 ml PBS gewaschen (1 ml abgenommen) und dann mit 50 U Thrombinprotease (Amersham, Freiburg) beladen. Dabei wurde die Säule verschlossen und die Inkubation fand bei RT über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde eluiert, dabei wurden die ersten 3 Tropfen verworfen und das Eluat aufgefangen. Es

wurden noch weitere fünf Fraktionen hergestellt, indem mit jeweils 1 ml PBS gespült wurde. Zur Kontrolle wurde von allen Fraktionen und den zuvor erhaltenen Überständen 50 µl abgenommen, mit 6 x Lämmli versetzt und eine Coomassiefärbung angefertigt. Anschließend wurden die Eluate 1-3 und 4-6 gepoolt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Das rekombinante Protein wurde bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Aufreinigung des Anti-Inhibitor-1 Antikörperserums

Der Antikörper wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dazu wurde das System der N-hydroxysuccimid (NHS) Sepharose (*NHS activated sepharose 4 fast flow*; Amersham) verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass die Sepharose über einen *Spacerarm* mit 6-Aminohexansäure gekoppelt ist. Die terminale Carboxylgruppe wurde durch Veresterung mit NHS aktiviert. Diese Reaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion, bei der sich das Gleichgewicht durch eine starke Säure zur Rückreaktion verschiebt und somit die Aminohexansäure zugänglich für Liganden macht. Als Ligand wurde das rekombinante Protein verwendet, das mit seiner primären Aminogruppe und der Carboxygruppe eine kovalente Amidbindung eingeht. Diese Bindung ist chemisch stabil. (Abb. 2.4)

Das rekombinante Inhibitor-1 Protein wurde hierfür in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer® 7K MWCO; Pierce, Bonn) überführt und mit *coupling* Puffer über Nacht bei 4 °C umgepuffert. Nach der Dialyse wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. 1 ml NHS Sepharose wurde in eine 10 ml Biorad Säule (Biorad, München) gegeben und 15 mal mit 1 ml eiskalter 1 mM HCl aktiviert. Die Säule wurde von unten verschlossen und es wurden 450 µg rekombinanter Inhibitor-1 auf die Säule gegeben, welcher über Nacht bei 4 °C an die Sepharose koppelte. Am nächsten Tag wurde eluiert und vom Eluat eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Sepharose wurde mit einem 6 maligem Wechsel zwischen jeweils 3 ml Waschpuffer und 3 ml Blockpuffer behandelt und in 3 ml Ethanol (20%) bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Zur Antikörperaufreinigung wurden 10 ml Antikörperserum verwendet. Das Ethanol wurde aus der Säule eluiert und mit dem o.g. Wechsel zwischen Blockpuffer und Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit dem Antikörperserum beladen, welches mit Hilfe einer Pumpe und einer Durchflussrate von 0,5 ml/min bei 4 °C zirkulierte. Am nächsten Tag wurde das Antikörperserum in ein 15 ml Falcon Gefäß überführt und die Säule mit 10 ml PBS bei RT gewaschen. Die Eluierung erfolgte in 3 Fraktionen mit Glycin (0,1 M; pH=2,5). Es wurde jeweils mit 2,2 ml Glycin eluiert und mit 200 µl Tris-HCl (1 M; pH=9,0) neutralisiert. Von den Antikörperfraktionen wurde anschließend eine Proteinbestimmung durchgeführt.

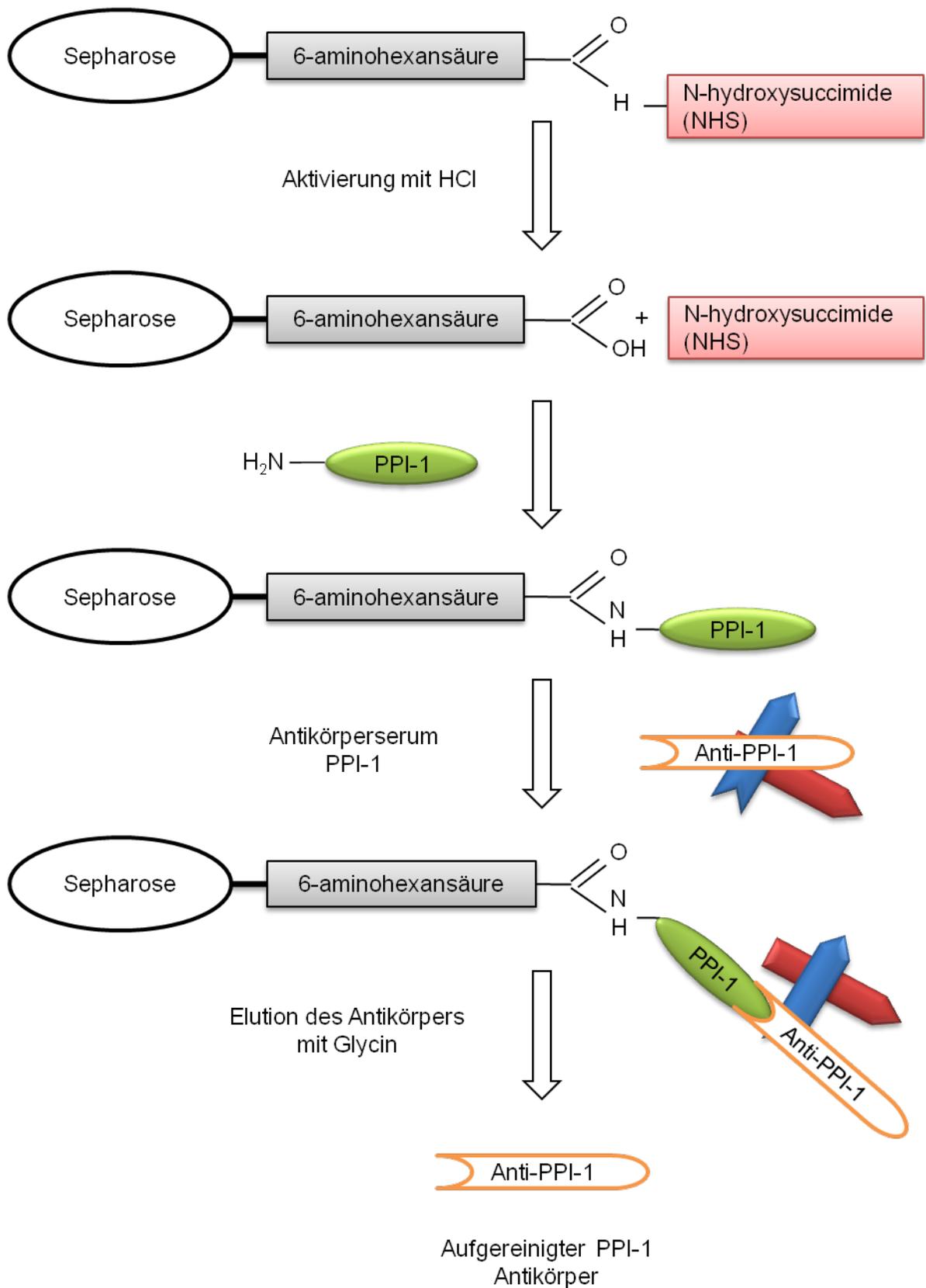


Abb. 2.4

Schema der Antikörperaufreinigung

2.4 Proteinchemische Arbeitstechniken

2.4.1 Herstellung von Proteinhomogenaten

Homogenate aus Kardiomyozyten

Die kultivierten und behandelten Kardiomyozyten wurden zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Homogenisierungspuffer-1 (300 µl / 1 Mio Zellen) zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit Hilfe einer Insulinspritze (4 x Kanüle 21Gx1½, 0.8x40 mm, Nr. 2; 4 x Kanüle 27Gx¾, 0.4x19 mm, Nr. 20) durch Scherkräfte zerkleinert. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer 1

Tris HCl (1,5 mol/l, pH 8,8)		2 ml
EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0)		1 ml
SDS 20%		15 ml
NaF (1 mol/l)		3 ml
Glycerol		10 ml
Aqua bidest.	ad	100 ml

Homogenate aus Gewebe

Gewebshomogenate wurden aus -80 °C tiefgefrorenem menschlichen Herzgewebe; Hirn-, Muskel-, Herzgewebe der Ratte und Skelettmuskulatur des Kaninchens hergestellt. 200 mg Gewebe wurden entnommen, in eine mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Porzellanmörser gegeben und unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit dem ebenfalls gekühltem Pistill zermahlen. Die Probe wurde anschließend in ein vorgekühltes Pottergefäß gegeben und mit 1 ml Homogenisierungspuffer-1 für Standardhomogenate und mit Homogenisierungspuffer-2 für die Immunpräzipitation versetzt und sofort mit einem Glas-Teflon-Potter (Potter S, Braun Biotech, Melsungen, mit Pottergefäß 2 ml) homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte 5 x 30 s, dazwischen wurde die Probe jeweils 30 s auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf; 16.000 g, 5 min) wurden 250 µl vom Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer 2

Tris HCl (pH 7,5)		25 mM
EDTA		5 mM
NaCl		150 mM
PMSF		1 mM
Triton X 100		1%
DOC		0,5%
Aqua bidest.	ad	100 ml

2.4.2 Trichloressigsäure Extraktion

Da der Inhibitor-1 eines der wenigen Proteine ist, dass sowohl hitze- als auch säurestabil ist (Folkes 1979; Nimmo 1978; Huang und Glinsmann 1976), konnten diese biochemischen Eigenschaften dazu verwendet werden, eine Anreicherung von Inhibitor-1 und eine Verminderung unspezifischer Bindungspartner für den Antikörper zu erreichen. Dies bedeutet, dass Inhibitor-1 sowohl durch Kochen bei 100 °C als auch bei der Inkubation mit 1,5% Trichloressigsäure nicht fällbar ist. Erst bei einer höheren Konzentration von Trichloressigsäure konnte Inhibitor-1 gefällt werden. Mit dieser Erkenntnis wurde eine Anreicherungsprozedur ausgehend von 1 g Gewebe durchgeführt. Das tiefgefrorene Gewebe wurde wie oben dargestellt zermahlen. Die Probe wurde anschließend in ein vorgekühltes 5 ml Pottergefäß überführt, mit 5 ml Homogenisierungspuffer (4 mM EDTA; 1,5% TCA) versetzt (Fällung aller nicht säurestabilen Proteine) und sofort mit einem Glas-Teflon-Potter (Potter S, Braun Biotech, Melsungen, Pottergefäß 5 ml) homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte auf Eis 5 x 20 s, dazwischen wurde die Probe jeweils 30 s auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Probe zum equilibrieren 30 min auf Eis belassen. Die Probe wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 25 min bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert (Ultrazentrifuge L7-65, SW40 Ti Rotator, Beckman Coulter, Krefeld). Der Überstand wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Heidelberg) überführt und das Pellet verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 100% Trichloressigsäure-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 19% mit einer anschließenden Fällung über Nacht. Bei dieser Konzentration kommt es zum Ausfall von Inhibitor-1 und anderen säurestabilen Proteinen wie z.B. der Inhibitor-2. Anschließend wurde die Probe für 25 min bei 4 °C und 17.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 320 µl 0,5 M TrisHCl pH=8,0 resuspendiert. Da Inhibitor-1 auch hitzestabil ist, wurde die Probe im Wasserbad gekocht (10 min, 100 °C), kurz auf Eis gestellt und 3 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf). Der Überstand wurde in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer® 3.5K MWCO; Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) überführt und über Nacht bei 4 °C gegen 4 l *Aqua bidest.* dialysiert. Das Dialysat wurde

mit einer Insulinspritze (Kanüle 27Gx³/₄, 0,4x19 mm, Nr. 20) aus der Kassette herausgeholt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur gezielten Anreicherung eines Proteins aus einem Proteingemisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Bei der Immunpräzipitation wurde der Inhibitor-1 Antikörper an Protein-A-Sepharose (Amersham) gekoppelt. Protein-A besitzt eine hohe Affinität zum Fc Teil vieler Immunglobuline und ist ein isoliertes Protein aus der bakteriellen Zellwand von *Staphylococcus aureus*, an dieses der Antikörper mit seinem Fc-Teil bindet. Somit bleibt der Fab-Teil für die Bindung des spezifischen Proteins zugänglich. Pro Immunpräzipitation wurden 10 mg Sepharose, 250 µg Antikörper und 20-50 mg Protein verwendet. Die Protein A Sepharose wurde mit 5 ml PBS auf 1,5 g *beads* für 2 h bei 4 °C auf einem Schüttler aufgequollen, anschließend abzentrifugiert, in 1 ml PBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Nachdem das Gewebe (Herz und Skelettmuskulatur) für die Immunpräzipitation vorbereitet wurde, wurde es für 30 min bei 4 °C 14.000 rpm zentrifugiert, um die vorhandenen Zelltrümmer und Kerne zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Um unspezifische Bindungen mit der Protein-A Sepharose zu vermeiden, wurden 1-2 mg Zelllysate mit 10 mg Protein-A Sepharose rotierend für 2 h bei 4 °C präadsorbiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 2.000 rpm, 4 °C). Die Kopplung des Antikörpers an Protein-A erfolgte rotierend 1 h bei 4 °C. Anschließend wurde die Sepharose zentrifugiert, der Überstand entfernt und das präinkubierte Zelllysate auf die Antikörper gekoppelte Sepharose gegeben. Nach der Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Sepharose zentrifugiert (3 min, 2.000 rpm, 4 °C) und zweimal mit 1 ml Homogenisierungspuffer-2 gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl zweifach reduzierendem SDS Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C gekocht und zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde auf ein SDS-Gel zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

2 x SDS Probenpuffer

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli	2 ml
Aqua bidest.	4 ml

2.4.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford und Lowry

Der Proteingehalt von Proben, die kein SDS enthielten, wurde mit dem Bradford Protein Assay Reagenz (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Bradford 1976). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz wurde mit IgG aus Rinderserum eine Standardreihe erstellt. IgG wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in *Aqua ad iniectabilia* gelöst und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Diese Stocklösung wurde zur Erstellung der Standardreihe in 0,1 M NaOH auf 0,1 mg/ml verdünnt. Die Proben wurden ebenfalls in 0,1 M NaOH gelöst und anschließend bei 595 nm in einem Spektrometer (Biorad) gemessen.

Nach Lowry (1951) erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes in SDS-haltigen Proben bei einer Absorption von 750 nm. Als Proteinstandard wurde IgG aus Rinderserum verwendet.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page; Laemmli 1970)

Die Zellhomogenate und Proteinextrakte wurden nach der Proteinbestimmung auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt. Zur proteinchemischen Analyse wurde die Proben mit 6 x SDS Probenpuffer nach Lämmli versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Normalisierung wurde in einigen Experimenten Calsequestrin im Western Blot herangezogen. Die Proteine wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuerst wurde ein Trenngel (10%-18%) und nach dessen Aushärten ein Sammelgel (5%; Tabelle 3.3) gegossen, in dem durch einen Kamm Taschen zur Beladung mit den Proben freigehalten wurden. Das Gel härtete über Nacht bei 4 °C aus und wurde anschließend mit den Proben beladen. Zur späteren Zuordnung der Proteine wurde eine Tasche mit einem Molekulargewichtsstandard (Broad-range, Bio Rad; Low Range, Bio Rad) beladen. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 5 mA/Gel gestartet, und die Spannung wurde nach 20 min auf 120–150 V, abhängig von der Gelkonzentration erhöht. Wenn die Lauffront die Unterkante erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt.

Trenngel

	8%	10%	12%	15%	18%
H ₂ O in ml	4,6	4,0	3,3	2,3	1,3
30% Acrylamid Mix in ml	2,7	3,3	4,0	5,0	6,0
1,5M Tris pH=8,8 in ml	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10% SDS in ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10% APS in ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED in ml	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004

Sammelgel (5%)

Acrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)	0,85 ml
Aqua bidest.	2,8 ml
Tris HCl (0,5 mol/l, 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

Laufpuffer

Tris		3,02 g
Glycin		14,4 g
SDS		1,0 g
Aqua bidest.	ad	1000 ml

2.4.6 Proteindarstellung in SDS-Polyacrylamidgelen

Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau und Silberfärbung sichtbar gemacht.

Coomassie-Färbung

Dazu wurden die Gele 60 min mit Färbelösung gefärbt. Die Gele wurden mit Entfärbelösung durch mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung entfärbt, bis der Hintergrund nur noch schwach blau war. Die entfärbten Gele wurden in zweifach destilliertem Wasser gewaschen und zwei Stunden in einem Vakuum-Geltrockner zwischen Cellophan[®]-Papier getrocknet

Coomassie-Färbelösung

Isopropanol	25%
Eisessig	10%
Coomassie-Blau	0,15%
Aqua bidest	64,85%

Coomassie-Entfärbelösung

Essigsäure	10%
Methanol	30%
Aqua bidest	60%

Silbernitratfärbung

Die Silbernitratfärbung ist eine der empfindlichsten unspezifischen Proteinfärbemethode und wurde nach dem Protokoll von Blum (1987) durchgeführt. Die Gele wurden in Reagenz 1 für 1 h fixiert, anschließend in 50% Ethanol dreimal 10 min gewaschen für 1 min in 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ reduziert, für 3 x 20 s mit *Aqua bidest.* gewaschen und mit Reagenz 3 für 15 min gefärbt 3 x 20 s mit *Aqua bidest.* gewaschen, mit Reagenz 4 entwickelt für 1-5 min und 2 x 30 s mit *Aqua bidest.* gewaschen. Die Reaktion wurde mit 1% Glycin für 10 min gestoppt und in Reagenz 5 inkubiert. Die Gele wurden in einem Vakuum-Geltrockner zwischen Cellophan[®]-Papier getrocknet.

Reagenz 1

Ethanol	40%
Eisessig	10%
Formaldehyd (37%)	0,05%
Aqua bidest.	49,95%

Reagenz 3

Natriumcarbonat	5%
Formaldehyd (37%)	0,04%
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,0005%
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Reagenz 2

Silbernitrat	0,2%
Formaldehyd (37%)	0,02%
Aqua bidest.	99,78%

2.4.7 Western Blot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch das Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®], 0,45 μm Porengröße, Schleicher & Schüll, Dassel) oder eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF; Hybond[™]-P, Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte für 75 min bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA. Eine Quellung des Gels wurde durch das enthaltene Methanol im Transferpuffer verhindert. Um die übergegangenen Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde diese für 5 min mit Ponceau S

Lösung gefärbt. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBS + TWEEN 20 (TBST) gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde mit Magermilchpulver (5% in TBST) oder Rinderserumalbumin (BSA; 2% 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 sofort zugegeben (Antikörper in Trockenmilch- oder BSA-Lösung verdünnt). Die Inkubation des primären, gegen das jeweilige Protein, spezifischen Antikörpers erfolgte in der Regel über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Die Verdünnungen und Lösungsmittel der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt ist, in Trockenmilch-Lösung für 1 h. Anschließend wurde dreimal für je 10 min in TBST gewaschen und die Membran für 5 min mit dem ECL+ Western Blot Detektions-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert. Dieses enthält ein Substrat der Peroxidase, welches nach Umsetzung eine Chemielumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), je nach Stärke der Lumineszenz für 2 s bis 60 min, belichtet und sofort entwickelt (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Wenn es nicht möglich war, die Ladungskontrolle (Calsequestrin) durch Schneiden der Membran parallel mitzuführen, wurden die Antikörper wieder von den Membranen entfernt. Hierzu wurde die Membran mit Strip-Puffer für 30 min bei 50 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend mehrmals mit TBST gewaschen. Anschließend konnte die Membran erneut mit primärem Antikörper inkubiert und der oben beschriebenen Prozedur unterworfen werden.

Tab.2.4 Antikörper für den Western Blot

Protein/Antikörper	Verdünnung	Hersteller	sekundärer Antikörper
Calsequestrin	1:2500 in TBST	Affinity Bioreagents	anti-rabbit (Sigma)
Phospho-DARPP-32 (Threonin ³⁵)	1:2000 in TBST	Cell Signaling Tec.	anti-rabbit (Sigma)
Phospholamban gesamt	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds	anti-mouse
Phospho-Serin ¹⁶ -PLB (PS16)	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds	anti-rabbit (Sigma)
Phospho-Threonin ¹⁷ -PLB (PT17)	1:5000 in TBST	John Colyer, University of Leeds	anti-rabbit (Sigma)
Inhibitor-1 G184	1:500 in TBST	Dr.P. Greengard	anti-rabbit (Sigma)
Inhibitor-1 aufgereinigt	1:2000 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	anti- rabbit (Sigma)
Inhibitor-1 Serum	1:5000 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	anti-rabbit (Sigma)
PP1	1:500 in TBST	Upstate	anti-rabbit (Sigma)
Präimmunserum Inhibitor-1	1:5000 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	anti-rabbit (Sigma)
Troponin-I	1:30000 in TBST	Chemicon	anti-rabbit (Sigma)
Troponin-I Phospho	1:20000 in TBST	HyTest	anti-mouse
anti-rabbit	in Milch	Cell Signaling Tec.	
anti-rabbit	in Milch	Sigma	
anti-mouse	in Milch	Sigma	

Transferpuffer

Tris 3,025 g
Glycin 14,4 g
Methanol 200 ml
Aqua bidest. ad 1000 ml

TBST 0,1%

10x TBS 100 ml
Tween 20 1 ml
Aqua bidest. ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Strip-Puffer

Tris HCl 4,925 g

Ponceaurot S Lösung

Ponceaurot S 0,5 g
Eisessig 1 ml
Aqua bidest. ad 100 ml

β-Mercaptoethanol 3,49 ml

SDS 10 g
Aqua bidest. ad 500 ml

pH mit NaOH auf 6,7 eingestellt

durch Faltenfilter geben

10x TBS

Tris 242,3 g
 NaCl 175,3 g
 Aqua bidest. ad 2000 ml
 pH mit HCl auf 7,5 eingestellt

Trockenmilch-Lösung

Magermilchpulver 5%
 TBST 0,1% ad 100 ml

2.4.8 Erfassung und Verarbeitung der Daten

Die belichteten Filme wurden digitalisiert (Durchlichtscanner Agfa Snapscan 600) und die Schwärzung der einzelnen Banden mittels Densitometrie quantifiziert (Auswertungssoftware MultiAnalyst, BioRad, München). Nach dem Abziehen des für die jeweilige Bande korrespondierenden Hintergrundes wurde sie auf den Mittelwert der Kontrollen bezogen. Die im Teil „Ergebnisse“ angegebenen Werte wurden durch die Bildung des Verhältnisses aus den so ermittelten Werten für das Protein und der zugehörigen Ladungskontrolle errechnet.

2.5 Adenovirale Expressionssysteme

Auf Grund der niedrigen Konzentration von Inhibitor-1 in Kardiomyozyten musste, um die Sensitivität verschiedener Assays zu steigern, eine Methode gefunden werden eine Überexpression auszulösen. Das Problem was sich hier darstellte waren die KM als Zellkulturmodell, da sich diese Zellen mit Überexpressionskonstrukten mit den üblichen Methoden (z.B. Kalziumchlorid oder Lipofectamin) nur schwer transfizieren ließen. Eine Alternative für einen Gentransport in die Zellen stellen hier die replikationsdefizienten, rekombinanten Adenoviren dar, da diese unabhängig von der Zellteilung der Zellen nahezu alle infizieren können. Hier wurde ein Expressionssystem mit nicht onkogenen Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) verwendet, die nach der Methode von He (1998) hergestellt wurden. Das verwendete adenovirale Genom enthielt Deletionen in den Regionen der *early genes* E1 ($\Delta E1$, Ad5 Nucleotide 1-3533) und E3 ($\Delta E3$, Ad5 Nucleotide 28 130 - 30 820). Die E1A Region leitet die Transkription und somit den produktiven Infektionszyklus ein. Das entstehende Genprodukt aktiviert andere frühe virale Gene durch die es zur Aktivierung von späteren viralen Genen kommt und somit auch zur Bildung von neuen Virionen. Die E3 Region kodiert für zwei Proteine, die den Transport des *Major Histocompatibility Complex* an die Zellmembran, sowie die Lyse infizierter Zellen inhibieren, ist aber für die Virusreplikation und Infektion der Zellen nicht essenziell. Letztendlich wurde durch diese Deletionen erreicht, dass der Virus sich nicht replizieren konnte und der Einbau von Fremdgenom bis 7,5 kb möglich ist (Benihoud 1999). Die DNA des zu untersuchenden Proteins wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in ein

Plasmid eingeschleust. Diesem Abschnitt ist ein Promotor vorgeschaltet und eine Polyadenylierungssequenz (PA) nachgeschaltet, sodass die gesamte Einheit die erfolgreiche Expression des zu untersuchenden Proteins in der Zelle gewährleisten soll. Die hier verwendeten Plasmide enthalten eine weitere Expressionskassette mit der ein Markerprotein (EGFP) koexprimiert wird. Zur Virusvermehrung wurde das gesamte Konstrukt durch eine Transfektion in eine E1A und E1B exprimierende menschliche, embryonale Nierenzelle gebracht (HEK 293T), in denen der Virus repliziert und vermehrt wurde. Die Viren sind selbst replikationsdefizient (Louis 1997). Abb. 2.5 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Virusherstellung. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Adenoviren verwendet. Das Konstrukt für den AdEGFP Virus (grün fluoreszierendes Protein wird unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert) wurde von Volker Röneck (MediGene AG, München) und das AdEGFP/Inhibitor-1 Konstrukt (Koexpression von Inhibitor-1 und EGFP unter Kontrolle von je einem CMV Promotor) von Dr. Thomas Rau (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt (Abb. 2.4). Durch EGFP kann die Transfektionseffizienz beurteilt werden. Der EGFP-codierende Abschnitt von pAdTrack-CMV stammt aus pEGFP-C1 (Biosciences, 2002). GFP selbst stammt aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura 1962; Morise 1974). Das Protein besteht aus 238 Aminosäuren und wiegt 27 kDa (Shimomura 1979; Prasher 1992). Es hat zwei Absorptionsmaxima (395 nm; 475 nm) und ein Emissionsmaximum (508 nm). In EGFP sind zwei Aminosäuren verändert. Serin⁶⁵ ist durch Threonin und Phenylalanin⁶⁴ durch Leucin ersetzt. Diese Veränderung führt vor allem zur Erhöhung der Leuchtkraft und zu einer schnelleren Reifung des Proteins bei 37 °C (Heim 1995; Cormack 1996).

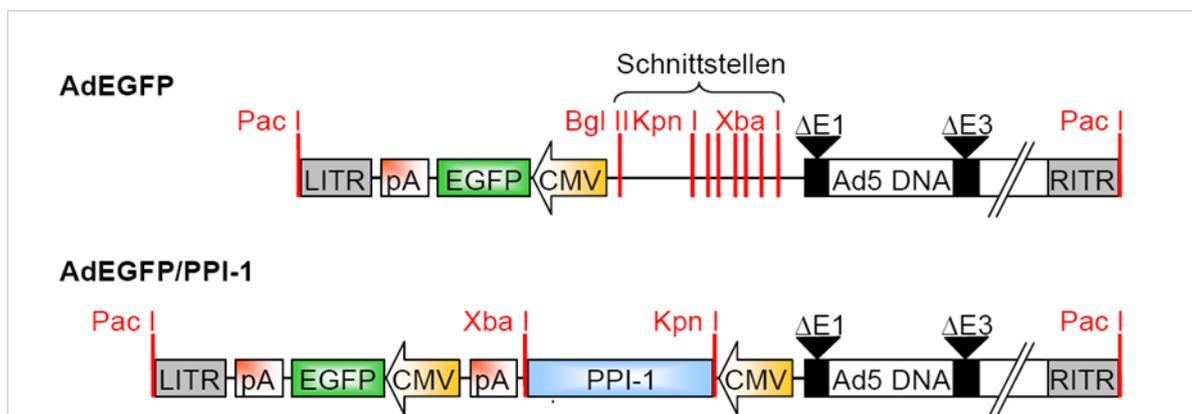


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der verwendeten rekombinanten Adenoviren

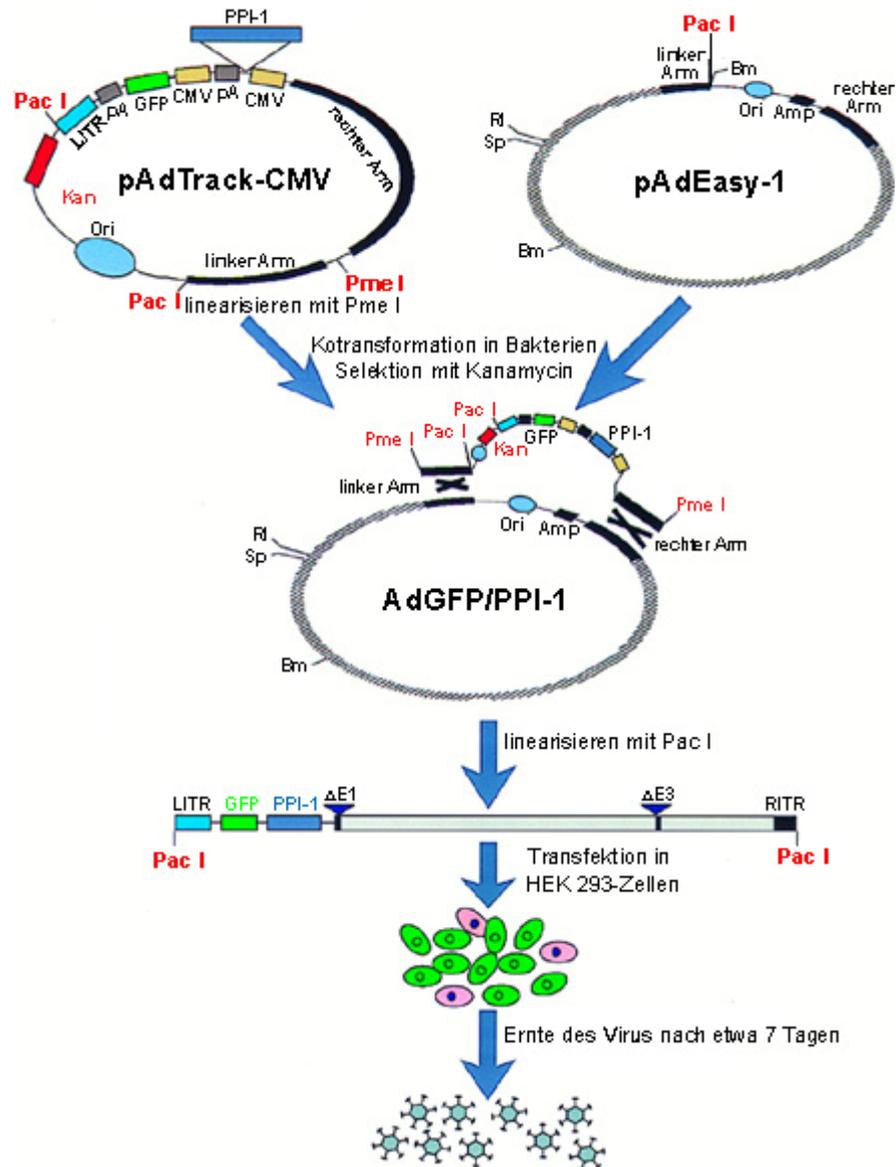


Abb. 2.6 Schema zur Virenvermehrung mit AdEasy-1 und pAdTrack-CMV. Entnommen aus (He 1998)

2.5.1 Vorbereitung der Transfektion viraler Konstrukte

Für die Transfektion des adenoviralen Plasmides AdEGFP/Inhibitor-1 musste die DNA mit Pac1 linearisiert werden. Hierbei fällt die Resistenz für Kanamycin und dessen Startregion weg. Nach dem Verdau von je 10 μg AdEGFP/Inhibitor-1 mit Pac1 wurde die DNA mit Glykogen gefällt. Das getrocknete Pellet wurde kurz vor der Transfektion in 15 μl *Aqua ad iniectionabilia* aufgenommen, wovon 7,5 μl für die Transfektion einer Zellkulturschale von 3,5 cm Durchmesser (\emptyset) verwendet wurden.

2.5.2 Virusanzucht

2.5.2.1 Zellkultur von HEK 293T-Zellen

Für die Adenovirus Anzucht ist eine S2-Genehmigung notwendig (E34-16/95). Es wurden HEK 293T 2D-Kultur für die Herstellung hochtitriger Virussuspensionen verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, die Hilfsgeräte autoklaviert oder kommerziell steril verpackt verwendet. Die Lösungen wurden autoklaviert, steril filtriert oder steril und pyrogenfrei im Handel erworben. Zur Kultivierung der HEK 293T-Zellen wurden Falcon Zellkulturschalen mit Zellkulturbeschichtung und einem Durchmesser von 14,5 cm. Die Bedingungen im Zellkulturschrank betragen konstant 37 °C bei 5% CO₂ Gehalt. Die Zellkulturschalen wurden mit 1% Gelatine 30 min bei 37 °C beschichtet. Bei Beginn der Aufzucht mit tiefgefrorenen HEK 293T-Zellen wurden etwa $1,6 \times 10^6$ Zellen auf eine beschichtete Ø 6 cm Schale gegeben. Das HEK-Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Auf eine Zellkulturschale mit Ø 14,5 cm wurden im Rahmen der Passagierung etwa 4×10^6 Zellen gegeben.

HEK-Medium

DMEM Glutamax

FCS* 10%

P/S 1%

*FCS wurde bei 56 °C für 1 h hitzeinaktiviert

Eine Passage erfolgte bei 90-95% Konfluenz. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Citrat Puffer zu den Zellen gegeben und 3-4 min bei 37 °C inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Ablösung kontrolliert. Es wurde 10 ml HEK-Medium zugegeben und diese Suspension wurde bei 4 °C und 1.000 rpm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml HEK Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturschalen aufgeteilt.

Citrat-Salz-Lösung

KCl 5,3 g

Na₃Citrat · (H₂O)₂ 2,2 g

Aqua bidest. ad 500 ml

autoklaviert

2.5.2.2 Transfektion des Ligationsprodukts

Für die Liposomen vermittelte Transfektion des linearisierten pAdEGFP/Inhibitor-1 wurde eine Ø 3,5 cm Zellkulturschale mit HEK 293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-95% kultiviert, um eine möglichst hohe Effizienz und Expression zu erhalten, sowie die mit der Transfektion einhergehende Hemmung des Zellwachstums zu verhindern. Das HEK-Medium wurde abgesaugt, durch 1 ml optiMEM ersetzt und die Zellen wieder in den Zellkulturschrank gestellt. In zwei Sammelgefäßen wurden 5 µl Lipofektamin und 5 µg linearisiertes pAdEGFP/Inhibitor-1 in je 250 µl optiMEM 5 min inkubiert, anschließend gemixt und weitere 20 min inkubiert. Das Gemisch wurde für 4 h auf die HEK Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde nach dieser Zeit abgesaugt und durch frisches HEK-Medium ersetzt. Die Ernte erfolgte zu dem Zeitpunkt, als sich bereits 30-50% der transfizierten HEK 293T-Zellen abgelöst hatten. Dies war nach 10-11 Tagen der Fall, so dass die noch anhaftenden Zellen mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abgespült wurden. Die Zellen wurden bei 4 °C und 600 g 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert. Um die Zellen aufzubrechen und so die Viren freizusetzen wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff gefroren, bei 37 °C (Wasserbad) wieder aufgetaut und kräftig gevortext. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die erhaltene Virussuspension wurde auf eine 10 cm Zellkulturschale mit HEK 293T, die eine Konfluenz von 80% hatten, gegeben. Nach 2 Tagen wurden die so entstandenen Viren nach oben genannter Methode geerntet und mit der Suspension 3 x 14,5 cm HEK 293T Zellkulturschalen infiziert. Die wiederum so gewonnenen Viren wurden verwendet, um 30 Schalen von HEK Zellen zu infizieren. Lag für die Virusanzucht bereits ein adhärenzfähiges Virus vor (AdEGFP), wurden drei Ø 14,5 cm Zellkulturschalen mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 5-10 pro Zelle infiziert, nach 1-2 Tagen geerntet und mit dem Viruskonzentrat 30 Schalen selber Größe infiziert.

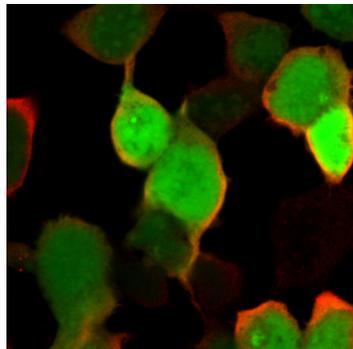


Abb. 2.7 AdEGFP/Inhibitor-1 Virus in HEK Zellen

2.5.2.3 Konzentration und Aufreinigung der Virussuspension

Die Viren wurden nach oben genannten Methode geerntet, indem die infizierten HEK 293T Zellen gesammelt und bei 4 °C und 600 g 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde in 7,5 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Alle Pellets wurden gepoolt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet in 7,5 ml PBS resuspendiert und vier Mal schockgefroren – aufgetaut und gevortext um die Viren freizusetzen. Diese Virussuspension wurde bei 4 °C und 1811 g, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Sammelgefäße aufgeteilt und das Pellet bei -80°C aufbewahrt. Die Überstände wurden dreimal mit vorgekühltem 1,1,2-Trichlortrifluorethan, das Lipide bindet, extrahiert. Der CsCl-Gradient besteht aus einer schweren (42,2% w/w), unteren und einer leichten (22,4% w/w), oberen CsCl-Phase, von denen je 4,5 ml in den Ultrazentrifugationsröhrchen übereinander geschichtet wurden. Der nach Trichlortrifluorethan Extraktion gewonnene Überstand wurde vorsichtig in äquivalenter Menge (bis zu 2,5 ml) auf den 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 rpm war die Virusbande sichtbar (Abb. 2.7). Diese Bande wurde mit einer Heparinspritze mit Kanüle (G27) abgenommen und in eine Dialysekassette (Slide-A-Lyzer®10K MWCO; Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) überführt.

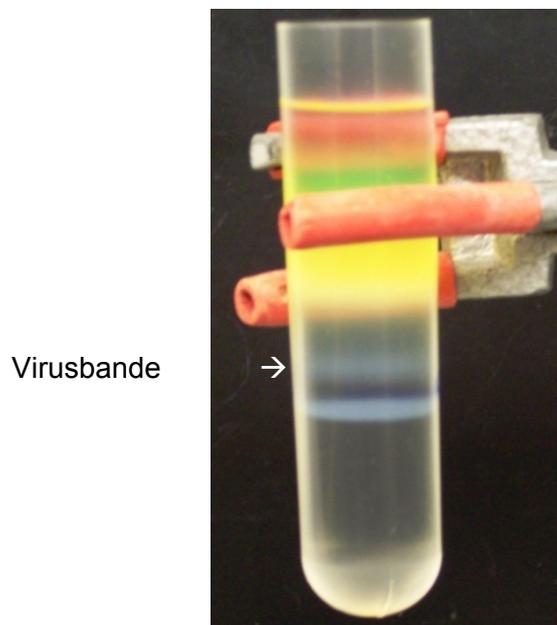


Abb. 2.8 Virusbande von AdEGFP/Inhibitor-1 nach der Auftrennung über einen CsCl Gradienten

Jeweils eine Kassette wurde zweimal 2 h gegen 1 l PBS und über Nacht gegen 1 l *Virus Storage Buffer* (VSB) dialysiert. Das Dialysat wurde am nächsten Tag aus der Kassette entnommen, Entnahme von 400 µl zur DNA Bestimmung, das verbleibende Volumen 1:1 mit 2 x Glycerol-VSB verdünnt und bei -20 °C gelagert.

<u>VSB</u>		<u>leichte CsCl-Lösung</u>	
NaCl	8 g	CsCl	22,4 g
KCl	372 mg	VSB ad	100 g
MgCl ₂ · (H ₂ O) ₆	204 mg	sterilfiltriert.	
1 M Tris-HCl, pH=7,	10 ml		
Aqua bidest. ad	1000 ml	<u>2 x Glycerol-VSB</u>	
autoklaviert.		NaCl	292,2 mg
		BSA	50 mg
<u>schwere CsCl-Lösung</u>		1 M Tris, pH=8,0	0,5 ml
CsCl	42,2 g	Glycerol	25 ml
VSB ad	100 g	Aqua bidest.	25 ml
sterilfiltriert.		gevortext und sterilfiltriert	

2.5.2.4 Dichtebestimmung der biologisch aktiven Viren

Zur Dichtebestimmung der biologisch aktiven Viren (BAV) wurde die DNA extrahiert, gefällt und die Konzentration bestimmt. Ausgehend von der Annahme, dass 21 ng DNA $6,2 \times 10^8$ Viruspartikel entsprechen, von denen 1/3 biologisch aktiv sind, wurde dann die BAV berechnet.

2.5.2.5 Virustitrierung

Ausgehend von der oben errechneten BAV wurden Kardiomyozyten neonataler Ratten in 2D Zellkultur mit aufsteigenden Konzentrationen infiziert. Die infizierten Zellen konnten auf Grund der Expression von EGFP nach 24 h und 48 h im LSM begutachtet werden. Für diejenigen, bei denen nach 48 h alle Zellen gerade grün waren, wurde angenommen, dass eine Zellen von einem Virus getroffen wurde, so dass die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI = 1) dieser Kardiomyozyten eins entspricht. Über die Anzahl der Zellen und die Menge an Virus, mit der infiziert wurde, wurde die BAV erneut berechnet und das so gewonnene Ergebnis für die Untersuchungen an Kardiomyozyten-2D Zellkultur verwendet. Die biologische Aktivität der verwendeten Viren betrug bei AdEGFP/Inhibitor-1 5×10^7 BAV und bei AdEGFP 5×10^7 BAV.

2.6 Zellkulturmethoden

2.6.1 Herstellung einer Kultur primärer Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen

2.6.1.1 Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neonatale (1.-3. Tag postnatal) Tiere verwendet.

2.6.1.2 Organentnahme

Die Tiere wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühltem calcium- und bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) gelagert.

CBFHH

NaCl	136,9 mmol/l
KCl	5,36 mmol/l
MgSO ₄ (H ₂ O)	0,81 mmol/l
Glucose	5,55 mmol/l
KH ₂ PO ₄	0,44 mmol/l
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	0,34 mmol/l
HEPES	20 mmol/l

gelöst in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (Aqua ad iniectabilia), pH 7,5. Zur Herstellung wurden Stammlösungen benutzt, die mit Aqua ad iniectabilia angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose- und HEPES-Stämme, die nicht autoklavierbar sind, wurden steril filtriert. Stammlösungen und CBFHH wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.6.1.3 Trypsinverdau

Nach der Herzentnahme erfolgte die Zellpräparation und anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Zur Antibiose wurden Penicillin G und Streptomycin (P/S; 10.000 U/ml und 10.000 µg/ml; Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) und das später verwendete Zellsieb wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit CBFHH transferiert und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von kleiner als 2 mm^3 zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitleumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß, in dem nach weiterem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) durchgeführt wurde. Die Anzahl der Herzen pro Verdau schwankte zwischen 20 und 170, wobei ab 90 Herzen der Verdau in 2 parallelen Ansätzen durchgeführt wurde.

Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 9 ml (bei 60-70 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht; Neigungswinkel 15° , 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und einer Inkubation (10 min) unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das 2 ml inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins enthielt, überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (9 ml) und Triturierung (Auf- und Abpipettieren, weitleumige Pipette, 25-30 mal) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Die Zeiten der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurden dem Maß der Trübung angepasst, wobei eine maximale Zeit von 5 min nicht überschritten wurde. Dieser Wechsel von Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FKS wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes, durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte bei 60-70 Herzen im Mittel 4 h, wobei durchschnittlich 7 Sammelgefäße gefüllt wurden. Gefüllte Sammelgefäße wurden in der Zeit auf Eis gelagert.

Anschließend wurden die Sammelgefäße in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnehmen des klaren Überstandes wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und in einem Sammelgefäß (50 ml) gepoolt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit dem Rest gepoolt. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert und wiederum zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnahme des

Überstandes wurde das Zellpellet in 32 ml NKM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Zefa Laborcenter, München; Maschengröße: 250 µm) gegeben und das Sammelgefäß und das Sieb mit 10 ml NKM gespült. 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. Nach Abnehmen der für Mischkultur-EHTs benötigten Zellen wurde die restliche Zellsuspension auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser (Falcon, Heidelberg) verteilt, das Volumen auf etwa 12 ml pro Schale aufgefüllt und die Zellen für 1-1,5 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert, um eine Anreicherung der Kardiomyozyten auf etwa 70% im Überstand durch ihre im Vergleich zu den Nichtkardiomyozyten langsamere Anheftung zu erreichen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Kulturschalenoberflächen intensiv mit den Überständen gespült und alle Überstände in ein Sammelgefäß (50 ml) überführt. Die Kulturschalen wurden mehrmals kräftig auf den Sterilbankboden geschlagen, um noch vorhandene Kardiomyozyten vom Kulturschalenboden zu lösen, mit jeweils 2 ml frischem NKM erneut gespült und auch diese Überstände in das Sammelgefäß überführt. Die Zellzählung erfolgte wiederum nach Vitalfärbung in einer Neubauer-Zählkammer.

Trypsin-Stammlösung

100 mg Trypsin pro ml CBFHH
bei 4 °C über Nacht rotierend lösen.
Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter
steril filtrieren.

Trypsin-Arbeitslösung

Trypsin-Stammlösung 1,5 ml
DNase-Stammlösung 0,7 ml
P/S 0,5 ml
CBFHH ad 50 ml
Auf Eis lagern.

NKM

Dulbeccos Minimal Essential
Medium (DMEM)
10% FKS
1% P/S
1% L-Glutamin

DNase-Arbeitslösung

FKS (inaktiviert) 1 ml
DNase-Stammlösung 0,7 ml
P/S 0,5 ml
CBFHH ad 50 ml
Auf Eis lagern.

PBS
NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂HPO₄ (H₂O)₇ 1,15 g
KH₂PO₄ 0,2 g
Aqua bidest. ad 1000 ml
Mit HCl pH auf 7,4 einstellen.

2.6.1.4 Kulturbedingungen

Um die Anheftung der Kardiomyozyten am Kulturschalenboden oder den Deckgläschen (Marienfeld) zu erleichtern, wurden die Kulturschalen (Falcon, Heidelberg) mit Gelatine und anschließend mit Laminin (Sigma) beschichtet. Dazu wurden die Schalen mit Gelatine benetzt und für etwa 30 min in den Zellkulturschrank gestellt. Anschließend wurde die überschüssige Gelatine abgesaugt und mit Laminin (0,1% bei 37 °C) für 4 h inkubiert. Die Deckgläschen wurden zuvor mit 1% SDS Lösung entfettet, anschließend mit sterilem Wasser, 70% und 100% Ethanol gespült und dann getrocknet.

Gelatine

PBS

Gelatine 1%

P/S 1%

Lösen unter Erwärmen. Sterilfiltrieren. Lagerung bei 4 °C.

Die Aussaat der Kardiomyozyten erfolgte nach der Anreicherung. Die Zellsuspension wurde in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4 °C) und überstehendes Nicht-Kardiomyozyten-Medium abgenommen. Die Kardiomyozyten anschließend in Kardiomyozyten-Medium vorsichtig zu resuspendieren und in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² für Proteinanalysen und 1×10^4 Zellen/cm² für Immunzytologie ausgesät. Um die Überwucherung der Kardiomyozyten durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das Kardiomyozyten-Medium den Antimetaboliten 5-Brom-2-deoxyuridin (BrdU), der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank. Nach 24 h war ein großer Teil der Kardiomyozyten angeheftet und die ersten spontanen Kontraktionen waren zu beobachten. Spätestens 36 h nach der Aussaat hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet, der kohärent schlug. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen.

Kardiomyozyten-Medium

Minimum Essential Medium
(MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO₃,
ohne L-Glutamin)
10% FKS (inaktiviert)
1% BrdU
1% P/S

BrdU

BrdU 307,4 mg
Aqua ad iniectabilia ad 100 ml
sterilfiltrieren
Lagerung bei -20 °C im Dunkeln.

2.6.1.5 Intervention

Nachdem die Zellen ausgesät wurden, wurde der erste Mediumwechsel nach 36 h durchgeführt und die Kontraktion überprüft. Nach 48 h wurde mit der Intervention begonnen.

Intervention für die Überprüfung der Regulation der Inhibitor-1 Phosphorylierung durch Calcineurin

Nach Aussat und Kontrolle der Kardiomyozyten in 3,5 cm Schalen wurden diese zur Verbesserung der Sensitivität des Assays mit Hilfe des Adenovirus Ad-Inhibitor-1-GFP MOI 3 infiziert. Nach 24 h erfolgte die Kontrolle der Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena). Die Inhibitor-1 überexprimierenden Zellen wurden anschließend mit dem spezifischen Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA; 100 nM) für 60 min inkubiert oder als Positivkontrolle β -adrenerg mit Isoprenalin (ISO; 10^{-9}) für 5 min stimuliert bzw. als Negativkontrolle mit DMSO inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend wurde 200 μ l Homogenisierungspuffer-1 auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber (Falcon) in ein Eppendorf Gefäß überführt. Mit einer Spritze (Nadeldurchmesser 0,45 mm) wurden die Probe homogenisiert und bei -80 °C gelagert.

2.7 Immunzytochemie

Die Kardiomyozyten wurde wie o.g. kultiviert. Eine eventuelle Intervention fand nach 48 Stunden statt. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Zellen wurden mit einer 4% Paraformaldehydlösung bei 37 °C fixiert. Formaldehyd fixiert die Zellen durch eine Vernetzung der Proteine und bei 37 °C bleibt die Morphologie erhalten. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung und Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in Blockpuffer für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper (Tabelle 2.5) in Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit WTBS gewaschen und 1 h mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundär Antikörper inkubiert, dreimal mit WTBS gewaschen und mit Moviol eingedeckelt. Die Fluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Lasermikroskopes (Axiovert 100, Zeiss, Jena) erstellt.

WTBS

Triton-X 100 0,25%
 FCS 1%
 in PBS

Blocklösung

Ziegenserum 10%
 in WTBS

Mowiol

Mowiol 4-88 2,4 g
 Glycerol 6,0 g
 Aqua bidest. 6 ml
 TrisHCl (0,2 M, pH 8,5) 12 ml

Mowiol wurde in Glycerol und Wasser durch mehrstündiges Rühren gelöst, dann TrisHCl zugeben und 10 min bei 50 °C geschüttelt. Anschließend 15 min bei 5.000 g zentrifugiert

Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd 4 g
 Minimum Essential Medium 100 ml
 unter erhitzen lösen, anschließend steril filtrieren und bei -20 °C lagern

Tabelle 2.5 Antikörper für Immunzytochemie

Protein/Antikörper	Ver-dünnung	Hersteller	sekundärer Antikörper
Inhibitor-1 G184	1:50 in TBST	Greenguard	Cy3 anti-rabbit (Dianova)
Inhibitor-1 aufgereinigt	1:100 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	Cy3 anti-rabbit (Dianova)
Inhibitor-1 Serum	1:500 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	Cy3 anti-rabbit (Dianova)
Präimmunserum Inhibitor-1	1:500 in TBST	Ali El-Armouche, UKE Hamburg	Cy3 anti-rabbit (Dianova)
α-sarkomerisches Actinin	1:250	Sigma	Cy2 anti-mouse (Dianova)
Cy3 anti-rabbit	Blocklösung	Dianova	

2.8 Statistik

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechnet aus den Einzelwerten (n), angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels *student's t-test* und die Korrelation mit der *Spearman-rank Korrelation* ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Northern-Blot-Analyse von Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen

Um die Rolle von Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens die mRNA-Konzentration in menschlichen Herzen untersucht. Hierfür wurden insuffiziente Herzen (8 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, 8 Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie) mit nicht-insuffizienten Spenderherzen (8 Patienten Herzen) (Tabelle 3.1) verglichen. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus diesen Herzen gewonnen. Zur quantitativen Beurteilung der aufgetragenen Gesamt-RNA-Mengen wurden die Blots mit der Sonde des *housekeeping*-Gens GAPDH rehybridisiert. In der statistischen Auswertung wurde die Inhibitor-1 mRNA Menge auf GAPDH normalisiert. Wie in Abbildung 3.1 ersichtlich, kommt es zu einer Herunterregulation der Inhibitor-1 mRNA Menge von ~60% in insuffizienten Herzen (Kontrollherzen: $1,87 \pm 0,28$ Densiometrische Einheiten, $n=8$ vs. DCM + ICM: $0,81 \pm 0,1$ Densiometrische Einheiten, $n=16$ Herzen; $p<0,05$). Ein Vergleich innerhalb der Gruppe insuffizienter Herzen, also zwischen dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie, ergab keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 3.1: Patientendaten für die mRNA Analyse

Patient #	Alter	Geschlecht	Diagnose	NYHA class	LVEF %	CI (l/min x m ²)	Drugs
1	44	M	NF (SAB)				n.d.
2	52	M	NF (ICB)				n.d.
3	50	M	NF (SAB)				n.d.
4	42	F	NF (CIC)				n.d.
5	31	M	NF (HT)				n.d.
6	35	M	NF (HT)				n.d.
7	36	M	NF (HT)				n.d.
8	45	M	NF (HT)				n.d.
9	47	M	DCM	IV	16	2,1	DGNCA
10	65	M	DCM	IV	17		DNR
11	56	M	DCM	III-IV	25	1,7	DGNCA
12	44	M	DCM	IV		2,7	DGNCAR
13	59	M	DCM	III		1,7	DGNCA
14	33	M	DCM	III	40	3,5	DGNA
15	35	F	DCM	IV	25	1,9	DGNARO
16	62	M	DCM	IV	<20	2,2	DGAR
17	61	F	ICM	III-IV	20		n.d.
18	57	M	ICM	III-IV			DGNR
19	62	M	ICM	IV			DGNR
20	66	M	ICM	III-IV	16	1,9	DCA
21	64	M	ICM	IV	20-30		DNA
22	46	M	ICM	III-IV			n.d.
23	54	M	ICM	III-IV			DGNR
24	64	M	ICM	III-IV	22	1,8	DGNARO

LVEF, Linksventrikuläre Auswurfraction; CI, Herzindex. Diagnosen: ICB, Intrazerebralblutung; SAB, Subarachnoidalblutung; CIC, zerebrale Ischämie; HT, Schädel-Hirn-Trauma; DCM, idiopathische dilatative Kardiomyopathie; ICM, ischämische Kardiomyopathie; NF, nicht-insuffiziente Spenderherzen. Medikamente: A, ACE-Hemmer oder Angiotensin II Rezeptorantagonisten; C, Kalzium Kanal Blocker; D, Diuretika; G, Herzglykoside; N, Nitrate; R, Antiarrhythmika (**keine β -AR-Blocker**); O, Dopamin/Dobutamin; nd, unbekannt

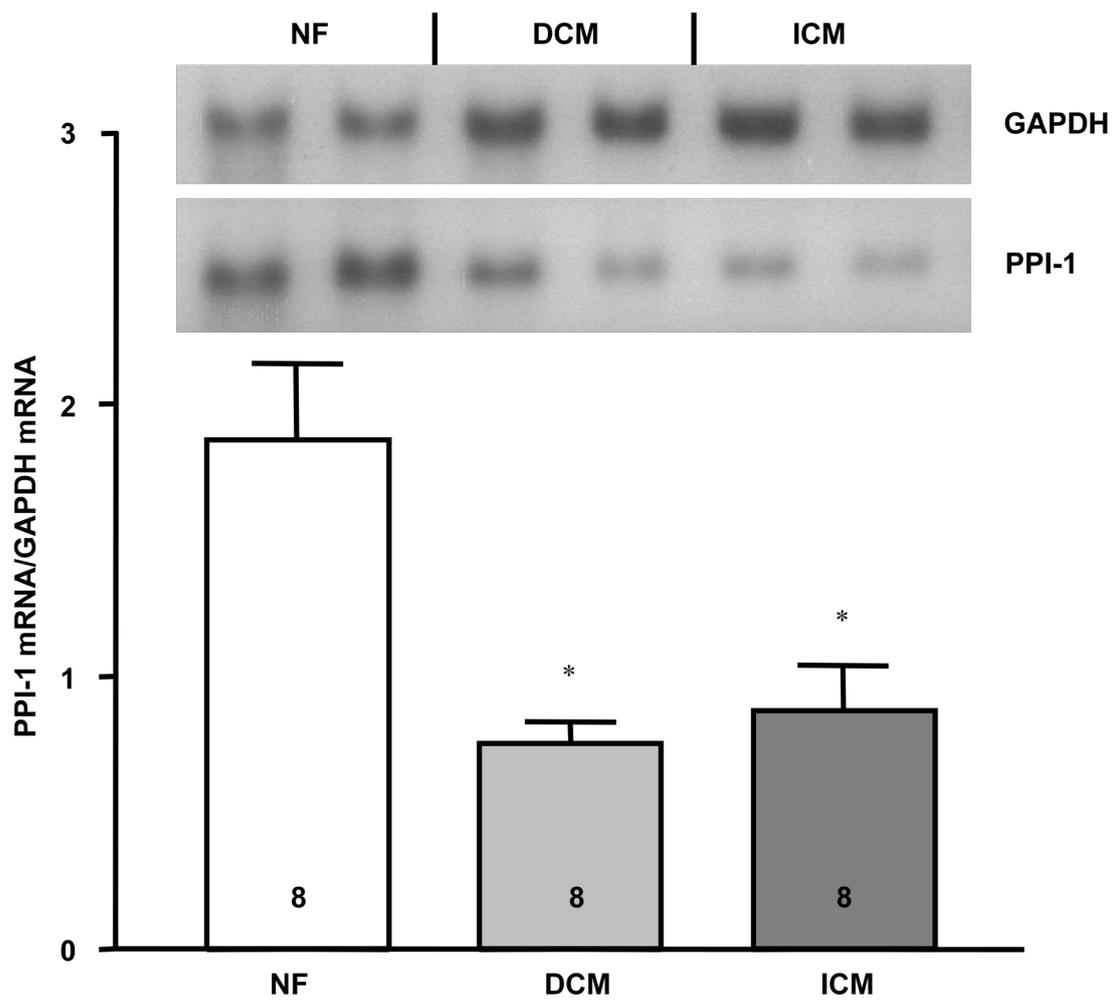


Abb. 3.1 Northernblot-Analyse der Inhibitor-1 (PPI-1) mRNA Menge in insuffizienten menschlichen Herzen. Der repräsentative Northernblot (oben) und die statistische Auswertung (unten) zeigen die mRNA Menge von Inhibitor-1 in linken Ventrikeln bezogen auf die GAPDH. Rechts oben sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben.

* $p < 0,05$.

3.2 Inhibitor-1 in SDS-Standardhomogenaten menschlicher Herzen nach Carr et al. (2002)

Nach der veränderten mRNA Menge von Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz wurde überprüft, ob sich dieses Ergebnis ebenfalls in der Proteinkonzentration widerspiegelt. Hierzu wurde ein polyklonaler Antikörper, der über die Firma Eurogentec hergestellt wurde, verwendet. Von der Firma stand ein unaufgereinigtes Inhibitor-1 Antikörperserum zur Verfügung. Die SDS-Standardhomogenate linker Ventrikel (11 DCM; 11 ICM; 11 NF) zeigten im Westernblot eine prominente Bande bei 29 kDa. Es wurde vorerst davon ausgegangen, dass diese der Inhibitor-1 Bande entsprach (Carr 2002). Die densitometrische Auswertung und der Bezug auf Calsequestrin ergaben keinen Unterschied zwischen Kontroll- und insuffizienten Herzen (Abb. 3.2).

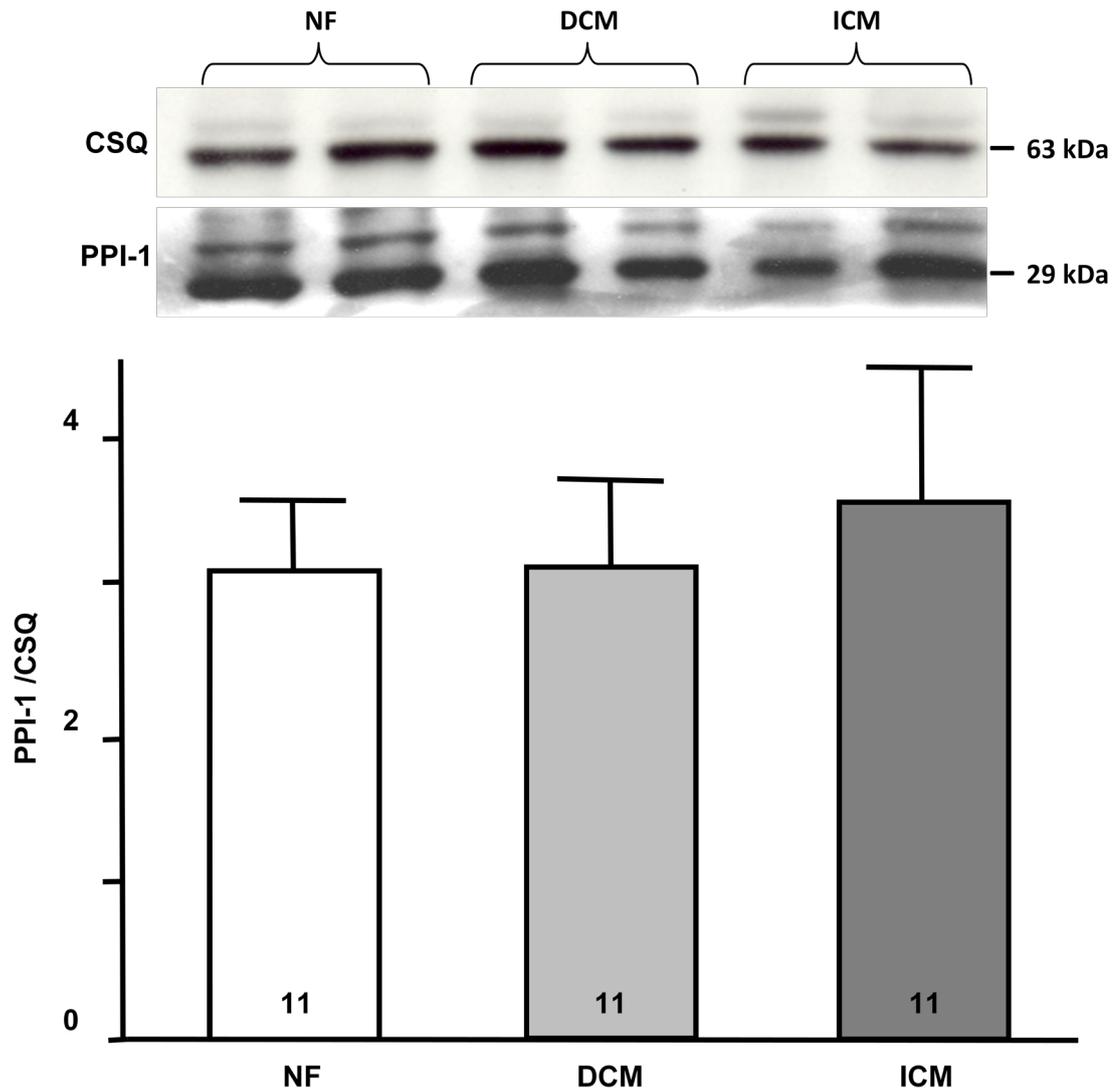


Abb. 3.2 Westernblot-Analyse der Inhibitor-1 (PPI-1) Proteinmenge in Standard-SDS-Homogenaten insuffizienter menschlicher Herzen nach Carr et al. Der repräsentative Westernblot (oben) und die statistische Auswertung (unten) zeigen die Proteinmenge von Inhibitor-1 im linken Ventrikel bezogen auf Calsequestrin. Rechts oben sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben.

3.3 Test des Antikörperserums an Proteinhomogenaten mit adenoviral überexprimiertem Inhibitor-1 und Vergleich mit Präimmunserum

Die Tatsache, dass die mRNA von Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz herunterreguliert ist, dass sich nach Carr et al. die Proteinmenge von Inhibitor-1 nicht verändert und der in der Literatur diskrepanten Meinungen über die Detektion von Inhibitor-1 führten zu einer gewissen Skepsis gegenüber der möglichen Spezifität unseres Antikörpers. Die Spezifität war bisher nicht untersucht worden. Mit Hilfe von Präimmunserum und einer Positivkontrolle (adenoviral überexprimiertes Inhibitor-1 in Kardiomyozyten) sollte dies untersucht werden.

Die Western Blot Analyse zeigte, dass das adenoviral überexprimierte Inhibitor-1 Protein der Ratte von unserem Antikörper auf einer Höhe von 29 kDa eindeutig erkannt wurde. Die Spezifität wurde durch die Inkubation mit Präimmunserum, bei der es zu keiner Detektion der Proteinbande kam, unterlegt. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass die Bande bei 29 kDa in menschlichen Herzhomogenaten sowohl bei der Inkubation mit dem Inhibitor-1-Antikörper als auch mit dem Präimmunserum detektierbar war (Abb. 3.3). Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass es sich bei der als zunächst spezifisch vermuteten Bande um eine unspezifische Reaktion handelt bzw. eine mögliche spezifische Inhibitor-1 Bande, durch eine unspezifische Reaktion auf derselben Höhe überlagert wird. Einerseits zeigte sich somit, dass der Inhibitor-1-Antikörper adenoviral überexprimiertes Inhibitor-1 erkennt, andererseits konnte aber nicht sicher gesagt werden, ob es zu einer Reaktion mit endogenem Inhibitor-1 kommt.

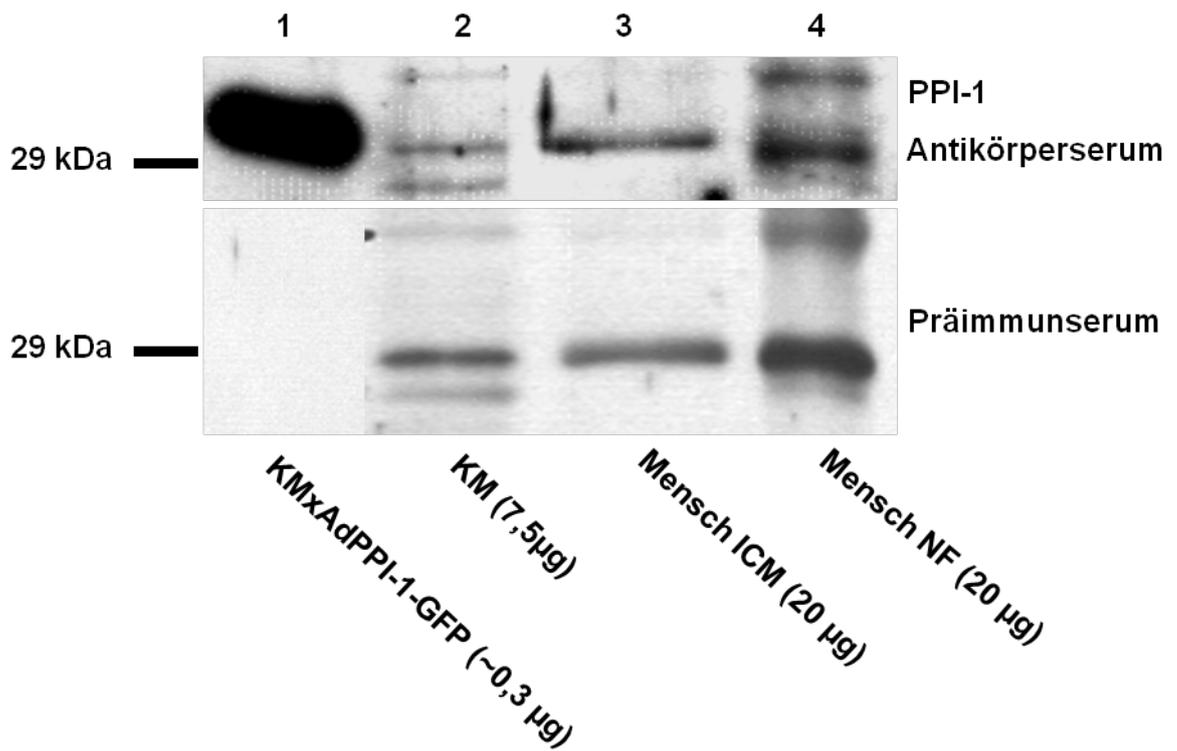


Abb. 3.3 Überprüfung der Inhibitor-1 (PPI-1) Proteindetektion mit unserem Antikörperserum und Präimmunserum in Standard-SDS-Homogenaten. Links sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Unterhalb der Westernblot Banden sind die verwendeten Gewebe angegeben. Als Positivkontrolle wurden Herzmuskelzellen mit AdPPI-1-GFP (MOI 3, 48 h) infiziert.

3.4 Immunzytologischer Test des Antikörperserums

Zur weiteren Überprüfung des Antikörperserums wurde dieses neben der proteinchemischen Analyse immunzytologisch auf Inhibitor-1 überexprimierenden Kardiomyozyten (AdGFP-PPI-1; MOI-1, 48 h) und Kontrollkardiomyozyten getestet. Die Kardiomyozyten wurden mit Inhibitor-1 Antikörperserum oder Präimmunserum inkubiert und anschließend mit einem rot fluoreszierenden Zweitantikörper gekoppelt. Der Antikörper zeigte hier überraschend im Vergleich zum Präimmunserum eine Lokalisation von Inhibitor-1 zur Z-Bande des Sarkomers der Kardiomyozyten (Abb. 3.4 A). Das adenoviral überexprimierte Inhibitor-1 Protein, welches keine Lokalisation zur Z-Bande zeigt, sondern ubiquitär in der Zelle lokalisiert, wurde mit dem Inhibitor-1 Antikörper in der Immunzytologie erkannt (Abb 3.5 B).

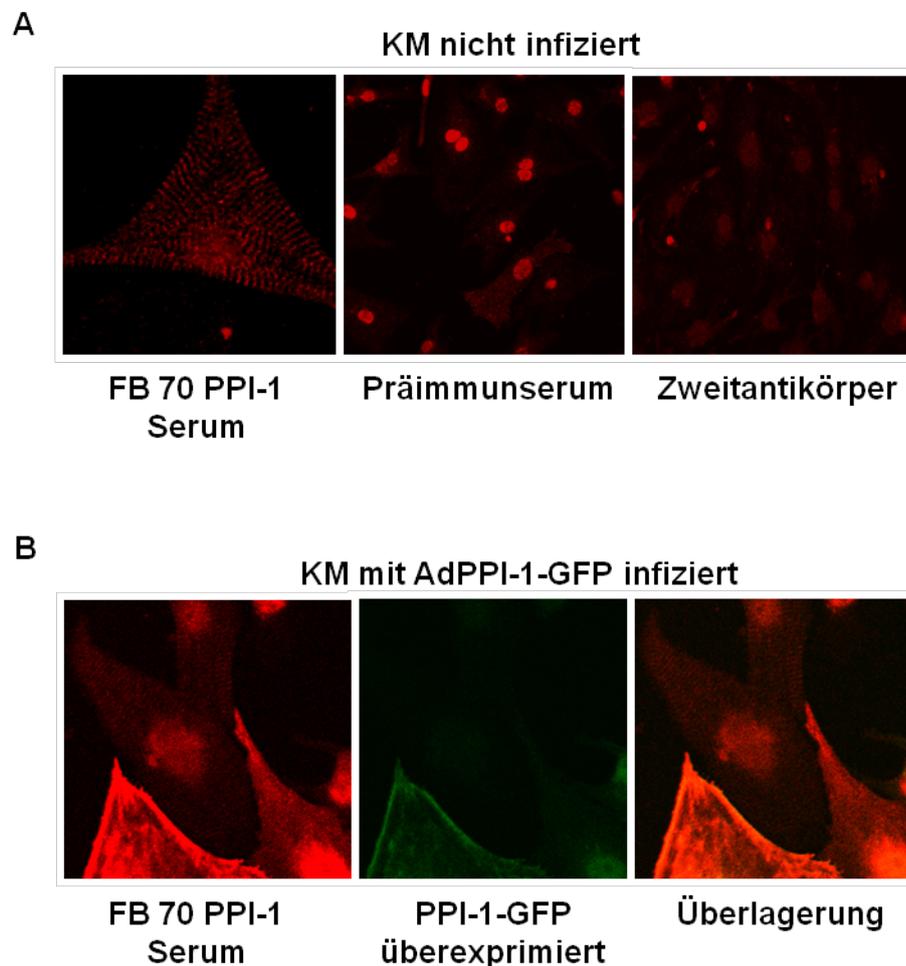


Abb. 3.4 Immunzytologische Untersuchung des Inhibitor-1 (PPI-1) Antikörperserums in Herzmuskelzellen der Ratte. A und B zeigen Herzmuskelzellen (KM) der Ratte. In B wurden diese mit AdPPI-1-GFP (48 h; MOI 1) infiziert.

3.5. Aufreinigung des Inhibitor-1 Antikörperserums

Die bisher erhaltenen immunzytologischen und proteinchemischen Ergebnisse ließen keine eindeutige Identifizierung von endogenem Inhibitor-1 zu. Auf Grund des großen Spektrums an Banden im Westernblot und der untypischen nicht zytosolischen Lokalisation von endogenem Inhibitor-1 in der Immunzytologie musste der Antikörper aufgereinigt werden. Nur so war es möglich, unspezifische Reaktionen zu reduzieren. Die Aufreinigung wurde affinitätschromatografisch durchgeführt. Hierzu wurde für die Aufreinigung ein GST-Inhibitor-1 Fusionsprotein (Abb 3.5 und 3.6) hergestellt. Dieses stand als Positivkontrolle und für die affinitätschromatografische Antikörperaufreinigung zur Verfügung. Die Aufreinigung des Inhibitor-1 Antikörperserums wurde über die Bindung an rekombinantes Inhibitor-1 Protein durchgeführt.

Im Anschluss an diese Aufreinigung wurde zuerst die Fraktion mit den wenigsten unspezifischen Banden im Westernblot ausgewählt und mit dem FB 70 Inhibitor-1 Antikörperserum und einem uns zur Verfügung gestellten Inhibitor-1 Antikörpers (G184 Inhibitor-1, Greengard, New York, USA) verglichen. Für diesen Westernblot wurden 20 µg Proteinhomogenate von Mensch Herz (HH) und Maus Gehirn (MB) verwendet (Abb. 3.7). Anschließend wurde diese Fraktion des aufgereinigten Inhibitor-1 Antikörpers im Westernblot und in der Immunzytologie verwendet. Als die Fraktion mit den wenigsten unspezifischen Banden unseres FB70 Inhibitor-1 Antikörperserums stellte sich die Fraktion II heraus. Es gab eindeutig weniger unspezifische Banden als im Serum. Im Weiteren ist der FB70 PPI-1 Antikörper immer die aufgereinigte Fraktion II und FB70 Serum ist das unaufgereinigte Antikörperserum.

In der Immunzytologie zeigte sich bei der Inkubation von Kardiomyozyten mit aufgereinigtem und unaufgereinigtem Antikörper, dass die Reaktion zur Z-Bande des Sarkomers in den Kardiomyozyten, die vom Antikörperserum angefärbt wurde, vom aufgereinigtem Antikörper nicht mehr dargestellt werden konnte. Dies korreliert mit der immunzytologischen Färbung der Kardiomyozyten mit dem G184 Inhibitor-1 Antikörper, der ebenfalls kein Signal zeigte. Somit handelt es sich bei der Reaktion unseres unaufgereinigten FB70 Inhibitor-1 Antikörperserums in den Kardiomyozyten um eine unspezifische Reaktion. Leider gab es keine Unterschiede zwischen Präimmunserum und Antikörper (Abb. 3.8). Endogenes Inhibitor-1 Protein konnte auch nach der Aufreinigung in der Immunzytochemie nicht dargestellt werden.

Bei der proteinchemischen Detektion wurden jeweils 20 µg Gesamthomogenate menschlicher Herzen, Herz Maus *wild type* (WT); Herz Maus Inhibitor-1 *Knock Out* (KO;

Herzgewebe Maus WT und KO wurden uns von Dr. P. Greengard und P. Ingrassia, New York, USA, zur Verfügung gestellt) und 3 µg in Kardiomyozyten adenoviral überexprimiertem Inhibitor-1 verwendet. Diese Proben wurden mit dem FB70-PPI-1 Antikörperserum, unserem aufgereinigtem Inhibitor-1 Antikörper, dem Inhibitor-1 G184 Antikörper und Präimmunserum inkubiert. Um die weitere Spezifität unseres Antikörpers zu testen, wurde das Inhibitor-1 Antikörperserum G184 mit rekombinanten Inhibitor-1 (37,5 µg) geblockt. In dieser Analyse zeigte sich, dass das adenoviral überexprimierte Protein durch die Antikörper spezifisch erkannt wurde und im Präimmunserum und den mit rekombinanten Protein vorinkubierten Antikörper nicht mehr detektierbar war, so dass dies eine spezifische Reaktion darstellt. Leider war die unspezifische Bande bei 29 kDa weiterhin vorhanden, diese zeigte sich sowohl mit dem FB70 Antikörper als auch mit dem G184 Antikörper und war sowohl im Präimmunserum als auch mit dem mit rekombinanten Protein vorinkubierten Antikörper sichtbar. Überraschenderweise war diese Bande sowohl in den Maus WT als auch in den Maus Inhibitor-1-KO Homogenaten darstellbar. Alle diese Daten zeigten, dass es sich um eine unspezifische Bande bei 29 kDa in Proteinhomogenaten handelt und endogenes Inhibitor-1 Protein wohl so gering konzentriert ist, dass es unterhalb der Detektionsgrenze unserer Methode für Inhibitor-1 in SDS-Standardhomogenaten liegt (Abb. 3.9 - 3.10).

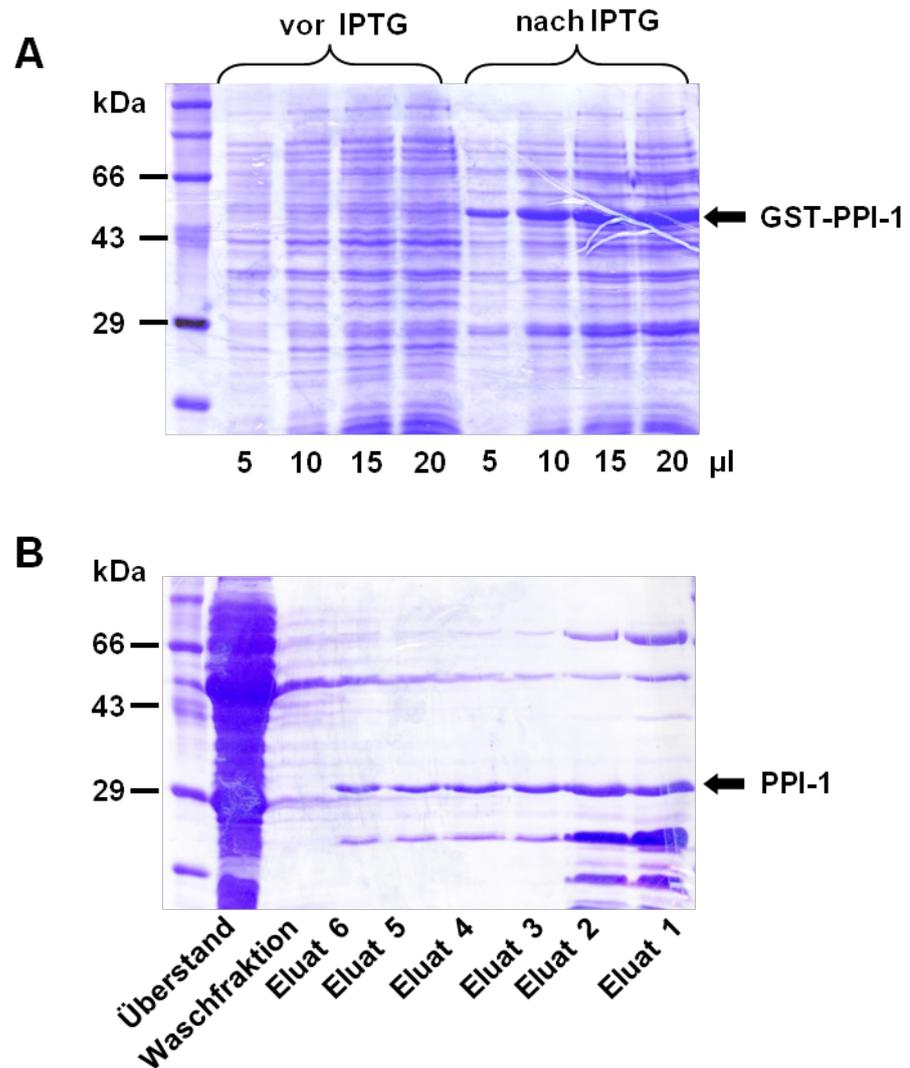


Abb. 3.5: Expression und Aufreinigung des rekombinanten Inhibitor-1 (PPI-1) der Ratte. A zeigt die Induktion der Proteinexpression von GST-PPI-1 durch Stimulation mit IPTG in einer Coomassiefärbung. Und B die Aufreinigung von rekombinanten GST-PPI-1 Protein durch Thrombin in einer Coomassiefärbung. Die Eluate 3-6 wurden als die reinsten angenommen, gepoolt und weiter verwendet. In A und B sind links die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

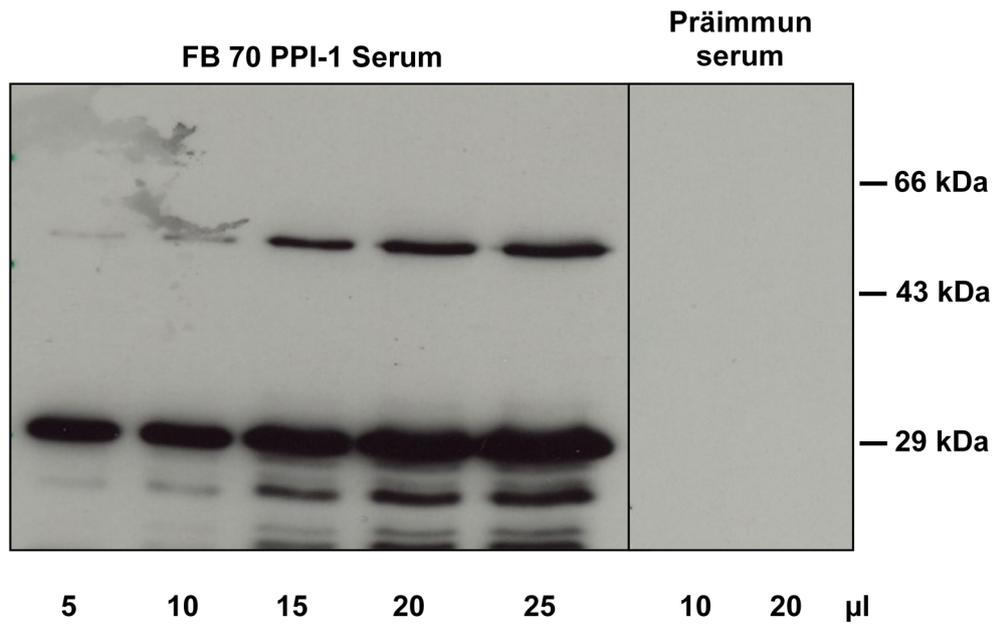


Abb. 3.6 Überprüfung des rekombinanten Inhibitor-1 Proteins im Westernblot. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

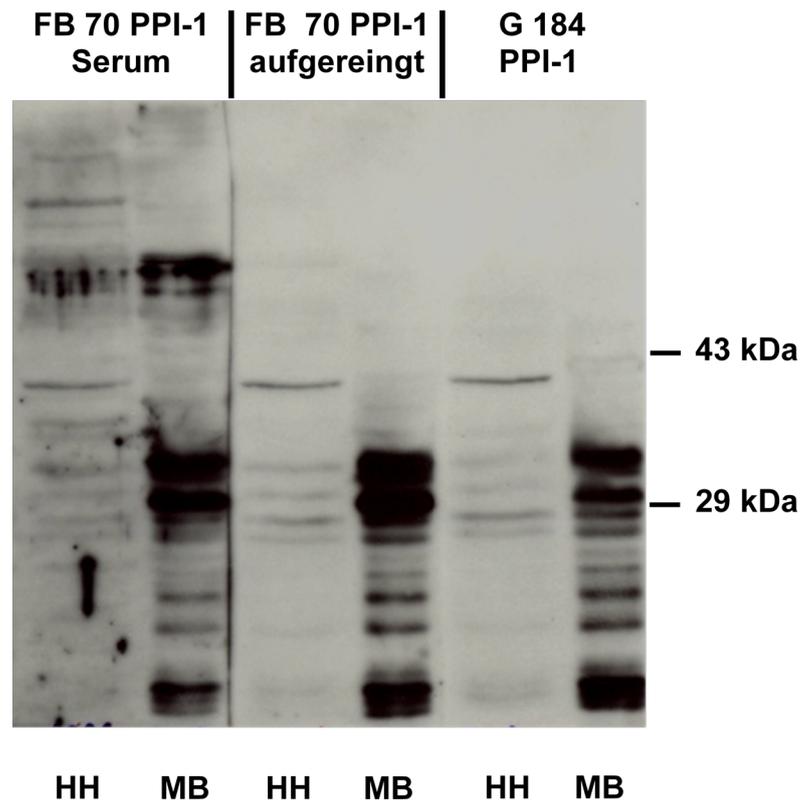


Abb. 3.7: Vergleich des Inhibitor-1 Antikörpers vor und nach der Aufreinigung in SDS-Standardhomogenaten. Der exemplarische Westernblot zeigt Proteinhomogenate von menschlichen Herzen (HH) und Mäusegehirn (MB), die mit dem FB70 Inhibitor-1 Serum, dem aufgereinigtem FB70 PPI-1 (Fraktion II) und dem G184 PPI-1 Antikörpers inkubiert wurden. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

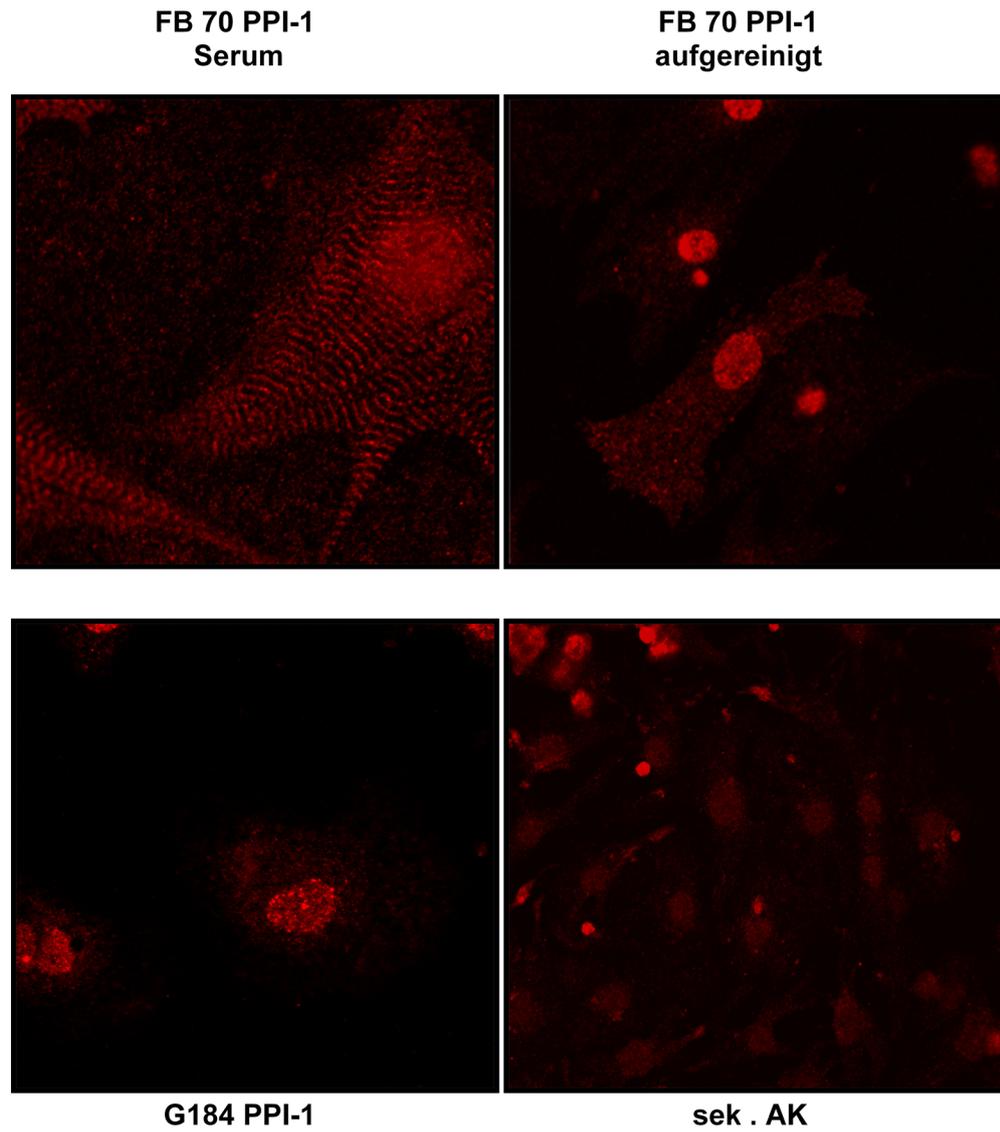


Abb. 3.8: Immunzytologische Testung des aufgereinigten Inhibitor-1 (PPI-1) Antikörpers auf Kardiomyozyten.

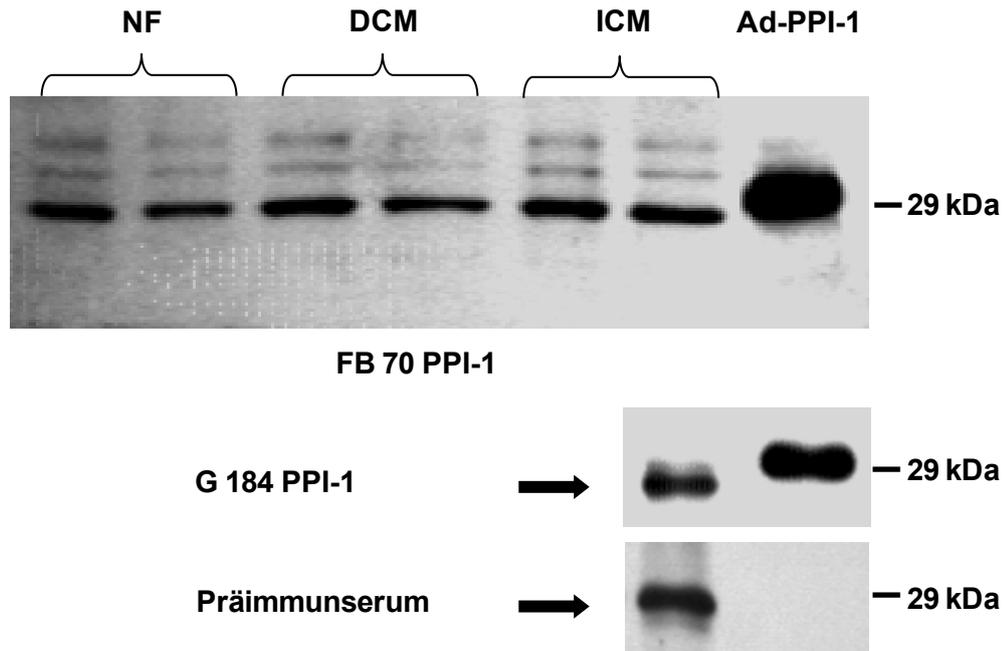


Abb. 3.9: Der aufgereinigte Inhibitor-1 (PPI-1) Antikörper auf Standard-SDS Homogenaten. Die Abbildung zeigt einen exemplarischen Westernblot von Standard-SDS-Homogenaten (Mensch Herz; 20 μ g) und adenoviral überexprimierten Inhibitor-1 in Herzmuskelzellen (Positivkontrolle; MOI 3; 48 h). Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

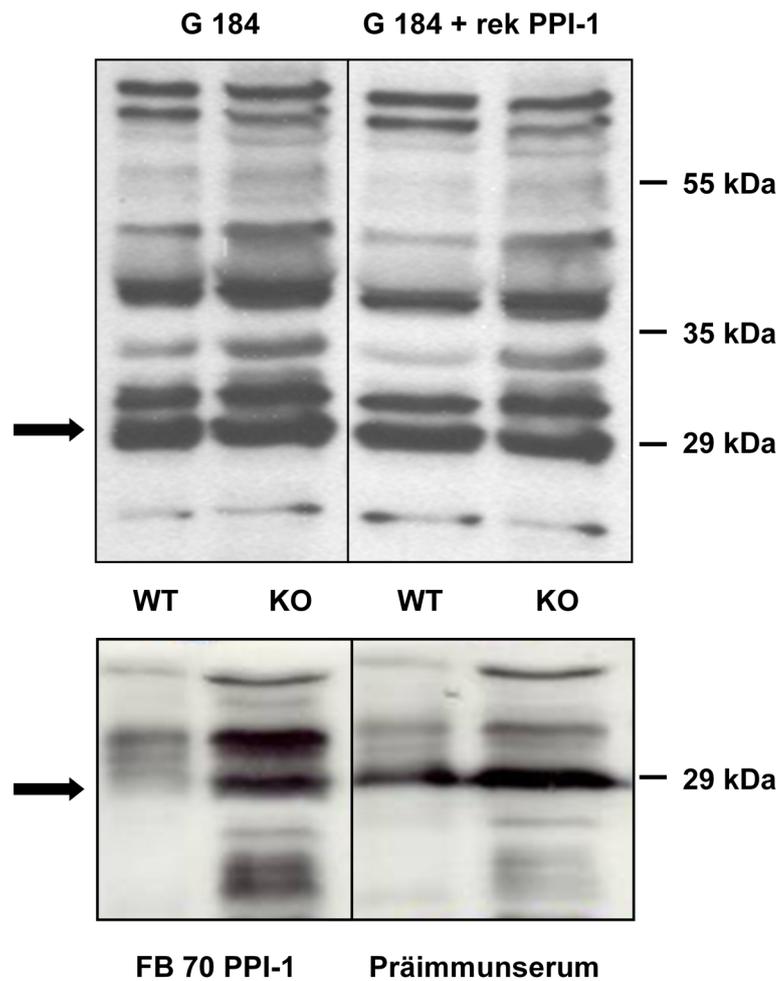


Abb. 3.10 Der FB 70 PPI-1 und G 184 PPI-1 (von Carr et al 2002) Antikörper auf Inhibitor-1 KO Standard-SDS-Homogenaten (Herz Maus). Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Der Pfeil zeigt die vermutete bzw. von Carr et al. beschriebene Bandenhöhe von Inhibitor-1 an.

3.6 Immunpräzipitation

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass eine endogene Detektion von Inhibitor-1 in Standardhomogenaten in unseren Händen nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde versucht, das endogene Inhibitor-1 Protein anzureichern. Als erste Methode hierfür wurde die Immunpräzipitation ausgewählt und versucht, Inhibitor-1 in menschlichem Herzgewebe (HH) und Skelettmuskulatur der Ratte (RS) anzureichern. In 6 unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Modifikationen konnte mit dieser Methode jedoch kein endogener Inhibitor-1 nachgewiesen werden. Es gab im Westernblot keine Unterschiede im Bandenmuster (Abb. 3.11). Die unspezifische Bande bei 29 kDa wurde ebenfalls angereichert.

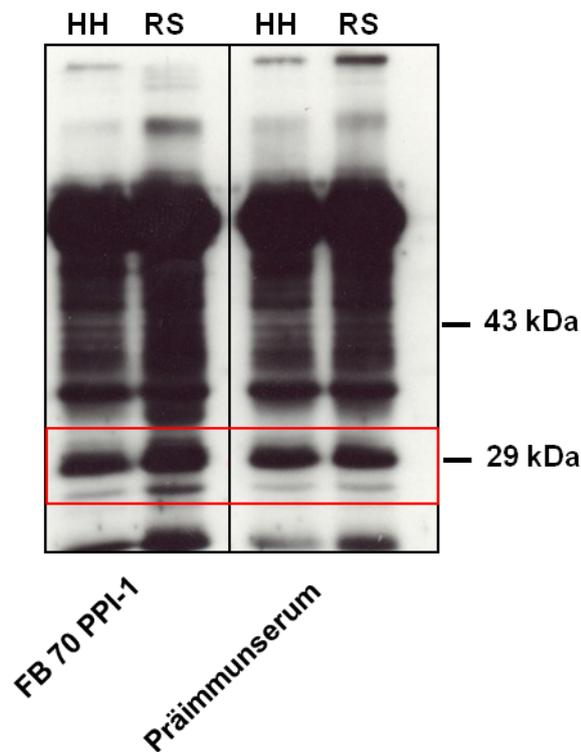


Abb. 3.11 Immunpräzipitation aus Gewebe (Mensch Herz HH; Ratte Skelettmuskulatur, RS) zur Detektion von Inhibitor-1 (PPI-1). Der exemplarische Westernblot zeigt eine Immunpräzipitation im Westernblot. Rot umrandet ist der vermutete Bereich von Inhibitor-1-Protein. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

3.7 Trichloressigsäure-Extrakte

Die vorangegangenen Experimente für eine immunologische Detektion von Inhibitor-1 führten nicht zum Erfolg. Aber eine weitere Möglichkeit zur Detektion von endogenem Inhibitor-1 eröffneten die außergewöhnlichen biochemischen Eigenschaften von Inhibitor-1. Inhibitor-1 ist sowohl hitzestabil als auch säurestabil (Huang 1976; Nimmo 1978; Folkes 1979). Dies bedeutet, dass Inhibitor-1 sowohl durch Kochen bei 100 °C als auch bei der Inkubation mit 1,5% Trichloressigsäure nicht fällbar ist. Inhibitor-1 konnte aber durch die Inkubation mit 19% Trichloressigsäure gefällt werden. Mit diesem Wissen wurde in einer aufwendigen Trichloressigsäure Extraktion versucht endogenes Inhibitor-1 Protein (Foulkes 1979; Neumann 1991; Gupta 1996) aus 1 g Ursprungsgewebe (Muskulatur, Gehirn, Herz Ratte; Abb.3.12 A; Herz Mensch und Muskulatur Kaninchen; Abb 3.12 B) zu konzentrieren. Die Darstellung erfolgte im Westernblot. Aus 1 g Gewebe konnten ca. 200 µg Extrakt gewonnen werden, dies ist eine über 500-fache Aufkonzentration des Ursprungsgewebes. Im Westernblot wurden die Extrakte (7 µg pro Spur) und das rekombinante Protein (6,25-25 ng) aufgetragen und mit dem FB70 Inhibitor-1 oder dem G184 Inhibitor-1 Antikörper, dem Präimmunserum und dem mit rekombinanten Protein vorinkubieren G184 Inhibitor-1 Antikörper untersucht. Überraschend zeigte sich nach der Antikörperinkubation eine Inhibitor-1 spezifische Bande, die sowohl bei der Inkubation mit Präimmunserum als auch mit dem vorinkubierten Antikörper nicht mehr zu detektieren war. Die Bande der Extrakte der Ratte entsprach in der Höhe dem rekombinanten Inhibitor-1 der Ratte bei 29 kDa. Bei der Auswertung des Westernblots fand sich eine ebenso spezifische Bande in den Extrakten von Kaninchen und Mensch. Diese Bande befand sich auf der Höhe von 26 kDa. Diese war ebenfalls nicht mehr in den Kontrollinkubationen mit Präimmunserum und mit rekombinanten Protein vorinkubierten Antikörper darstellbar (Abb. 3.12). Somit konnte mit dieser Methode endogenes Inhibitor-1 Protein eindeutig immunologisch im Westernblot identifiziert werden.

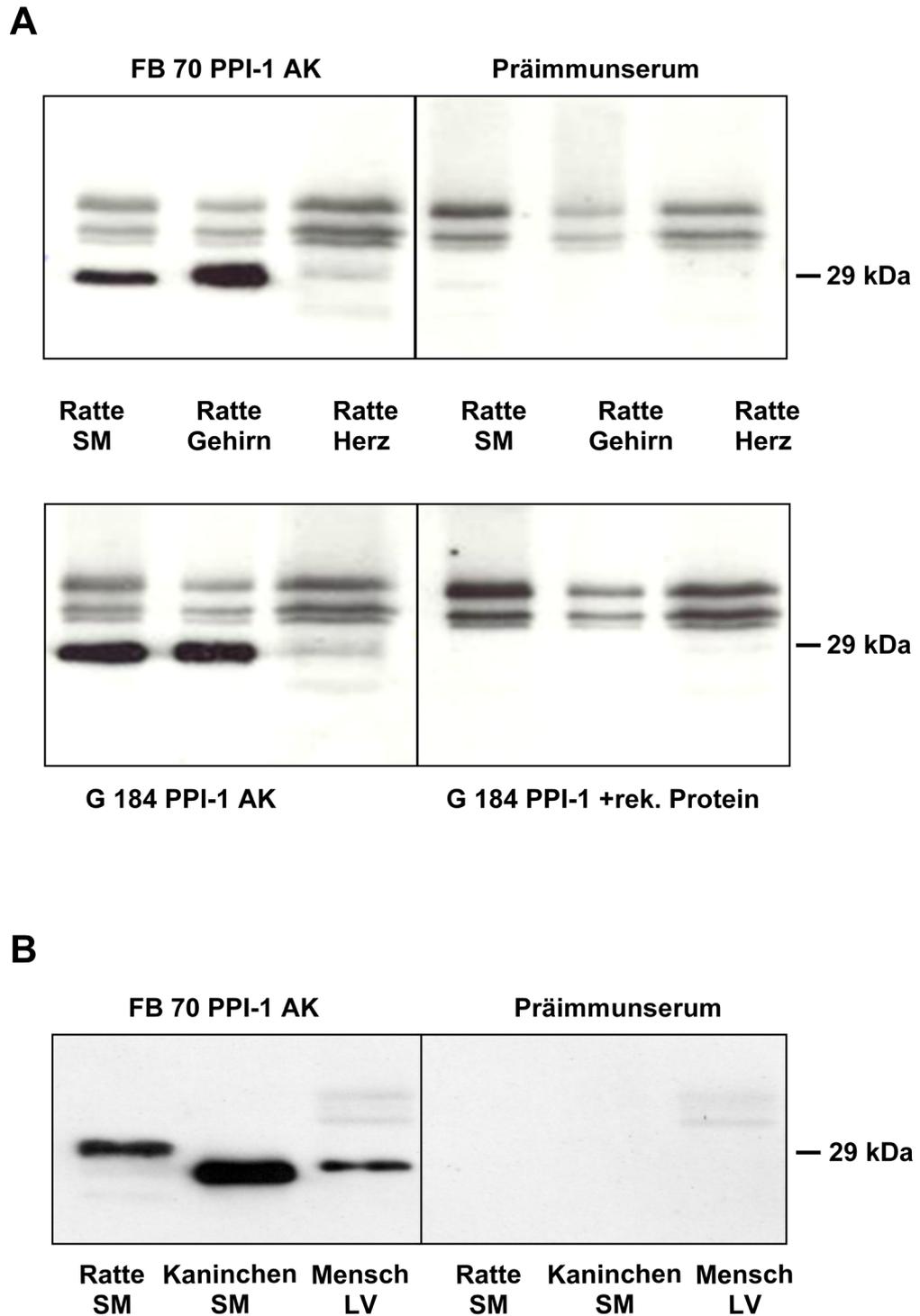


Abb. 3.12 Spezifische Inhibitor-1 (PPI-1) Proteindetektion im Westernblot in Trichloressigsäure-Gewebeextrakten. A zeigt die spezifische Detektion von Inhibitor-1-Protein (~29 kDa) in verschiedenen Geweben der Ratte. In B wurden die Gewebextrakte unterschiedlicher Spezies (Skelettmuskulatur Ratte ~29 kDa; Skelettmuskulatur Kaninchen ~26 kDa; Herz Mensch ~26 kDa) verglichen. In A und B sind rechts die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

3.8 Proteinchemische Untersuchung insuffizienter menschlicher Herzen in Trichloressigsäure-Extrakten und Gesamthomogenaten

Nach der eindeutigen Detektion von Inhibitor-1 im Herzen konnte die Untersuchung der Proteinmenge von Inhibitor-1 in insuffizienten und nicht-insuffizienten menschlichen Herzen mit Hilfe der Extraktionsmethode gemessen werden. Da nicht nur die Proteinmenge sondern vor allem auch der Aktivitätsgrad des Inhibitor-1, also dessen PKA-Phosphorylierung an Threonin³⁵, wichtig war, wurde dessen Phosphorylierung mit einem Phospho-Darpp32 (DARPP-32; Snyder 1992) Antikörper nachgewiesen. DARPP-32 ist das Strukturhomolog zu Inhibitor-1, welches in der Erkennungssequenz der Phosphatase-1 und der Threoninphosphorylierung mit Inhibitor-1 übereinstimmt. Der verwendete Phospho-DARPP-32 Antikörper erkennt die Phosphorylierung des Inhibitor-1. Untersucht wurden insgesamt 21 (Tabelle 3.2) menschliche Herzproben von insuffizienten (DCM n=9; ICM n=7) und nicht insuffizienten Patienten (NF n=5).

Bei der Extraktion wurden aus 1 g Herzgewebe des linken Ventrikels, in welchem im initialen Homogenat 120 ± 4 mg Protein enthalten waren, 234 ± 13 μ g Protein (n=21) gewonnen. Zwischen den Gruppen gab es keine Unterschiede in der erhaltenen Proteinmenge. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von menschlichem Herz-Extrakt parallel zu rekombinanten Inhibitor-1 Protein wurde zunächst die Inhibitor-1 Proteinkonzentration in nicht-insuffizienten Spenderherzen bestimmt. Diese Untersuchung ergab, dass die Inhibitor-1 Konzentration in den linken Ventrikeln mit 120 nM deutlich über der IC_{50} (~ 1 nM) liegt (Abb. 3.13). Für den Vergleich zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Herzen wurden im Westernblot 7 μ g Extrakt pro Spur aufgetragen, was einem eingesetzten Gewebe von ca. 30 mg entsprach. Es zeigte sich bei der Detektion mit dem Inhibitor-1 Antikörper eine deutlich schwächere Bande bei den insuffizienten Herzen im Vergleich zu den nicht-insuffizienten (58 % Reduktion der Inhibitor-1 Proteinkonzentration von DCM/ICM vs NF, $p < 0,05$). Die Inkubation der gleichen Proben mit einem phosphospezifischem Inhibitor-1 Antikörper (Phospho-DARPP-32) zeigte eine Reduktion von phosphoryliertem Inhibitor-1 in insuffizienten Herzen um 77 % ($p < 0,05$; Abb. 3.15)

Eine Normalisierung auf einen Proteinstandard war nach der Trichloressigsäure Extraktion nicht mehr möglich. Als zusätzliche Beladungskontrolle und als Kontrolle der äquivalenten Trichloressigsäure-Extraktion wurde eine Ponceau S Färbung von den Blots angefertigt. Parallel hierzu wurden SDS-Gele Coomassie und Silber gefärbt. Die Abbildung 3.14 zeigt die gleichmäßige Effektivität der Trichloressigsäure-Extraktion der verwendeten menschlichen Herzen.

Neben den Trichloressigsäure-Extrakten wurden von den gleichen Herzen SDS-Standardhomogenate (100 mg Gewebe) hergestellt, um in diesem Zusammenhang die Phosphatase-1 (PP1), Gesamt-Troponin-I (TnI), Phospho-Troponin-I (Phospho-TnI), Gesamtphospholamban (PLB) und Phospho-Serin¹⁶ Phospholamban (Phospho-PLB) zu untersuchen. Diese Proteine könnten ebenfalls in der menschlichen Herzinsuffizienz beeinflusst sein, da die Phosphatase-1 von Inhibitor-1 beeinflusst und die Phosphatase-1 wiederum Phospholamban beeinflusst. Weiterhin werden die Proteine Troponin-I, und Phospholamban wie ebenfalls Inhibitor-1 durch die PKA phosphoryliert. Somit könnte bei einer Veränderung von Inhibitor-1 auch eine mögliche Korrelation mit diesen Proteinen aufgezeigt werden.

Die Phosphatase-1 Gesamtproteinkonzentration wurde in Homogenaten analysiert und gegen Calsequestrin (CSQ) normalisiert. Calsequestrin ist das bedeutungsvollste Kalziumbindungsprotein im sarkoplasmatischen Retikulum. Die herzspezifische Isoform von Calsequestrin (Fliegel 1987) ist sowohl in der mRNA-Expression als auch in der Proteinexpression bei Patienten mit Herzinsuffizienz unverändert (Movsesian 1994; Meyer 1995). Aus diesem Grund war es möglich, Calsequestrin zur Normalisierung zu verwenden. Es wurden 20 µg Proteinhomogenat zur Western-Blot-Analyse verwendet. Es gab keine Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Herzen. Ebenfalls in den Homogenaten wurden Phospholamban, Troponin-I und deren Phosphorylierung untersucht und auf Calsequestrin normalisiert. Bei Phospholamban, Troponin-I und Troponin-I-Phospho gab es innerhalb der Gruppen keine Unterschiede (NF vs DCM/ICM: PLB/CSQ $5,58 \pm 0,60$ vs. $5,73 \pm 0,25$; TnI/CSQ $0,63 \pm 0,02$ vs. $0,64 \pm 0,03$; TnI-Phospho/TnI $1,14 \pm 0,05$ vs. $1,13 \pm 0,04$). Die Phospholamban-Phosphorylierung hingegen war in kranken Herzen signifikant vermindert (NF $1,11 \pm 0,32$, DCM/ICM $0,51 \pm 0,10$, $p < 0,05$) und korrelierte hierbei mit der Inhibitor-1 Phosphorylierung (Spearman $r = 0,70$, $p < 0,001$; Abb. 3.16).

Tabelle 3.2: Patientendaten für die Protein Analyse

Patient #	Alter	Geschlecht	Diagnose	NYHA class	LVEF %	CI (l/min x m ²)	Drugs
1	44	M	NF (SAB)				n.d.
2	52	M	NF (ICB)				n.d.
3	50	M	NF (SAB)				n.d.
4	42	F	NF (CIC)				n.d.
5	19	M	NF (SAB)				n.d.
9	47	M	DCM	IV	16	2,1	DGNCA
10	65	M	DCM	IV	17		DNR
11	56	M	DCM	III-IV	25	1,7	DGNCA
12	44	M	DCM	IV		2,7	DGNCAR
13	59	M	DCM	III		1,7	DGNCA
14	32	M	DCM	IV	40	3,5	DGNA
15	45	M	DCM	IV		1,3	NC
16	48	M	DCM	III-IV		1,4	DGNC
17	n.d.	n.d.	DCM				n.d.
18	57	M	ICM	III-IV			DGNR
19	65	M	ICM	IV	20		DGNR
20	66	M	ICM	III-IV	16	1,9	DCA
21	64	M	ICM	IV	20-30		DNA
22	46	M	ICM	III-IV			n.d.
23	54	M	ICM	III-IV			DGNR
24	64	M	ICM	III-IV	22	1,8	DGNAR O

LVEF, Linksventrikuläre Auswurfraction; CI, Herzindex. Diagnosen: ICB, Intrazerebralblutung; SAB, Subarachnoidalblutung; CIC, zerebrale Ischämie; HT, Schädel-Hirn-Trauma; DCM, idiopathische dilatative Kardiomyopathie; ICM, ischämische Kardiomyopathie; NF, gesunde Spenderherzen. Medikamente: A, Angiotensin converting enzym Hemmer oder Angiotensin II Rezeptorantagonisten; C, Kalzium Kanal Blocker; D, Diuretika; G, Herzglykoside; N, Nitrate; R, Antiarrhythmika (**keine β -AR Blocker**); O, Dopamin/Dobutamin; nd, unbekannt

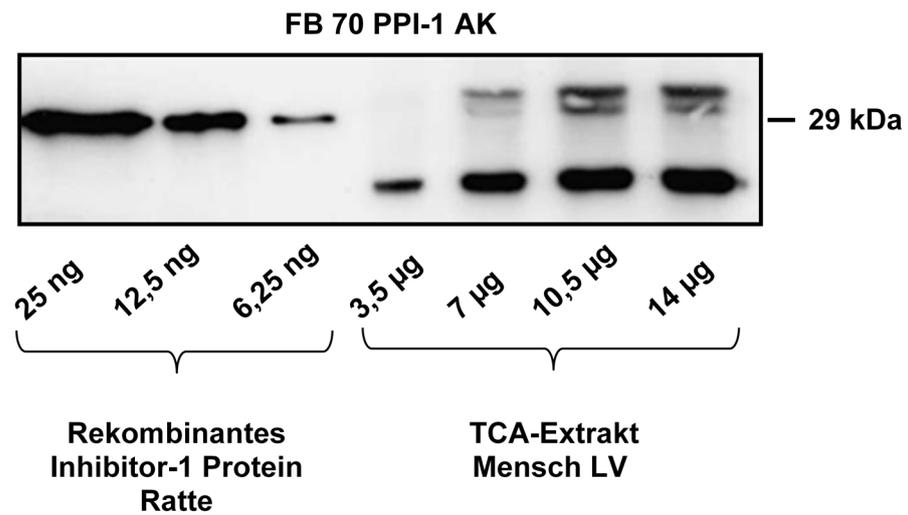


Abb. 3.13 Quantifizierung der Inhibitor-1 Gesamtkonzentration in Kontrollherzen. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

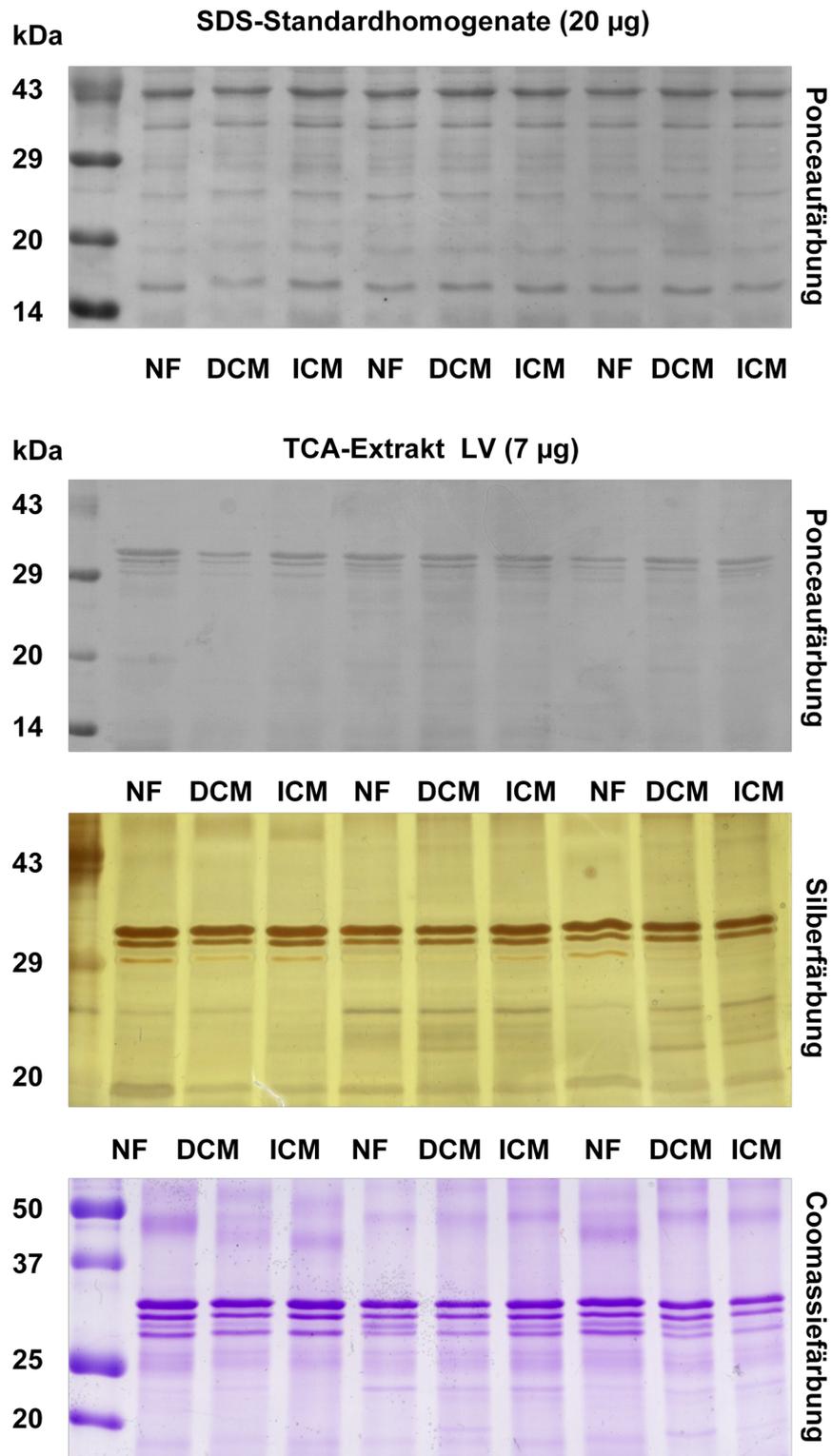


Abb. 3.14 Effektivität der Trichloressigsäure-Extraktion. Die exemplarischen Färbungen geben links die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards und rechts die Färbung an. Die Proben und die Reihenfolge sind in den exemplarischen Färbung identisch.

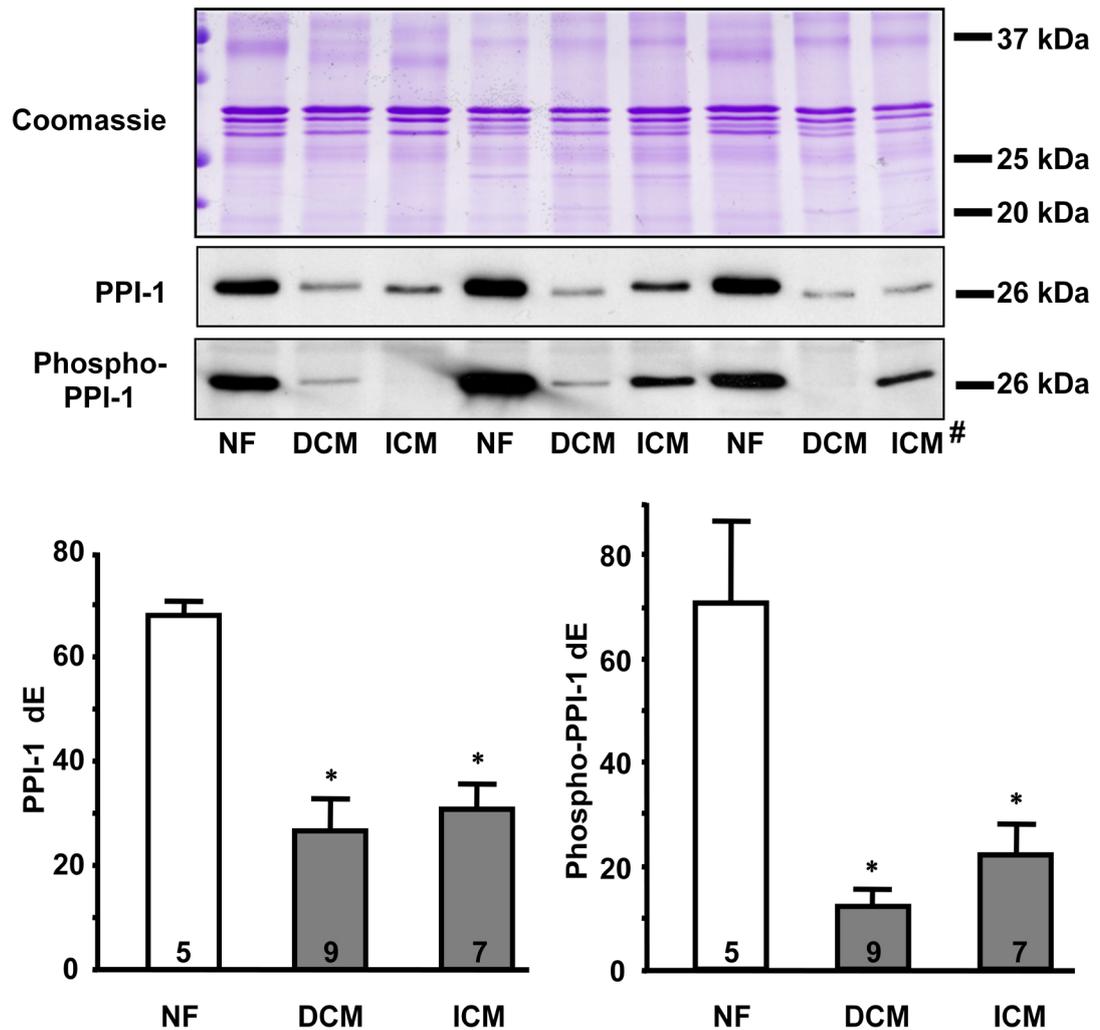


Abb 3.15 Proteinmenge und Phosphorylierung von Inhibitor-1 (PPI-1) in insuffizienten menschlichen Herzextrakten. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Coomassiefärbung und einen Westernblot (oben) und die statistische Auswertung (unten). Rechts oben sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die Ordinate in der statistische Auswertung gibt die Proteinmenge von Inhibitor-1 (PPI-1, links) und die Phosphorylierung von Inhibitor-1 (Phospho-PPI-1, rechts) in densitometrischen Einheiten an.

* $p < 0,05$ vs. NF

Die Proben und die Reihenfolge sind in den exemplarischen Westernblots und der Coomassiefärbung in 3.15 und 3.16 identisch

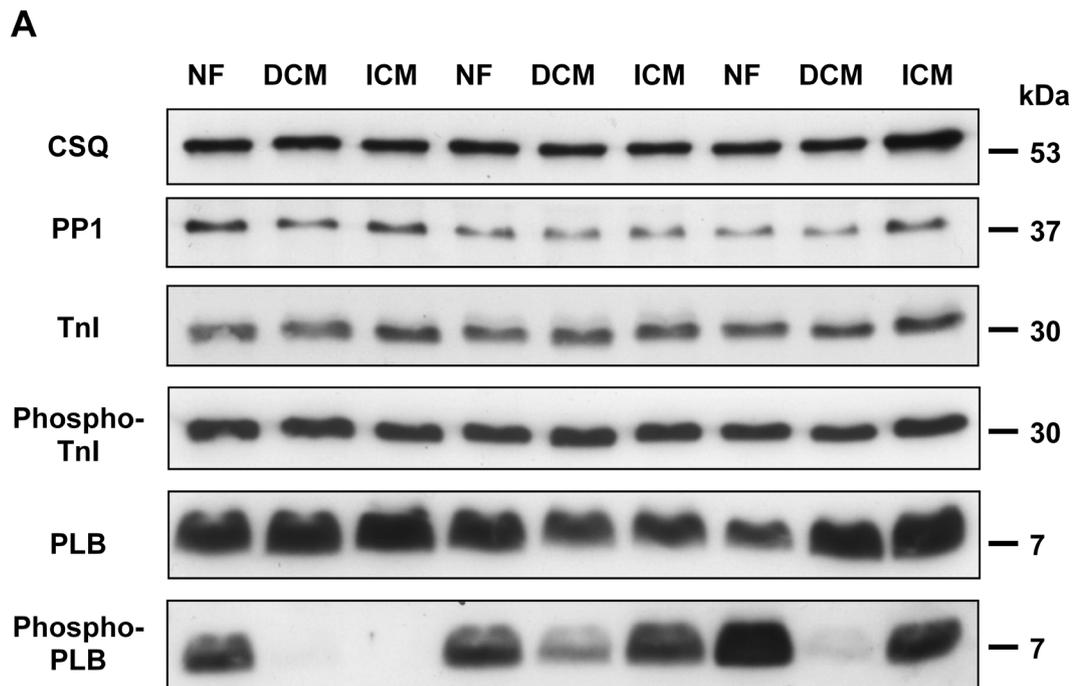
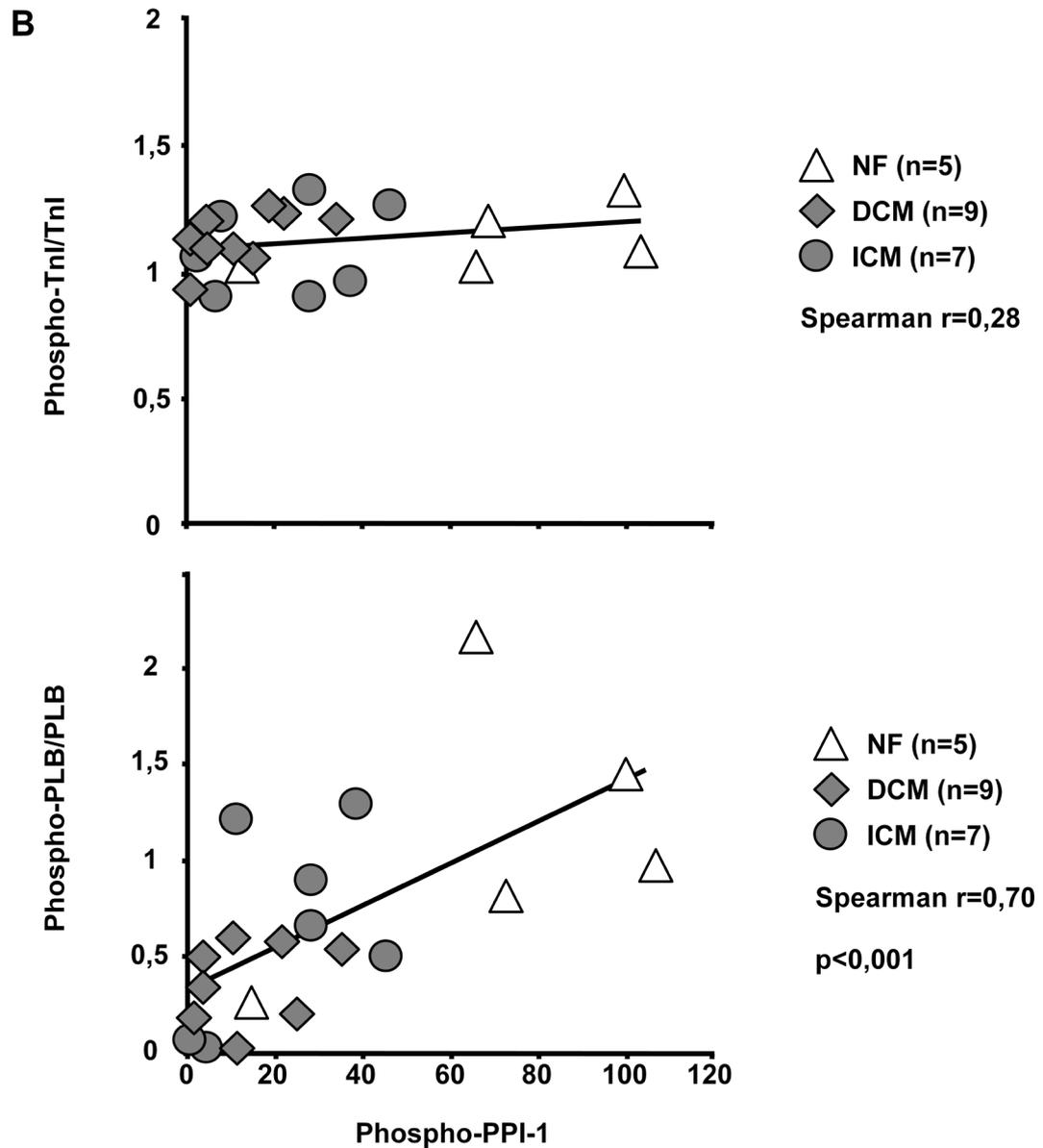


Abb. 3.16 Untersuchung der Phosphatase-1, Troponin-I und Phospholamban Proteinmenge in den menschlichen Herzen. Die Abbildung zeigt in A einen repräsentativen Westernblot von SDS-Standardhomogenaten der gleichen Herzen wie in Abb. 3.15. In Abb. 3.13 ist die zugehörige Pouceau S Färbung dargestellt. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.



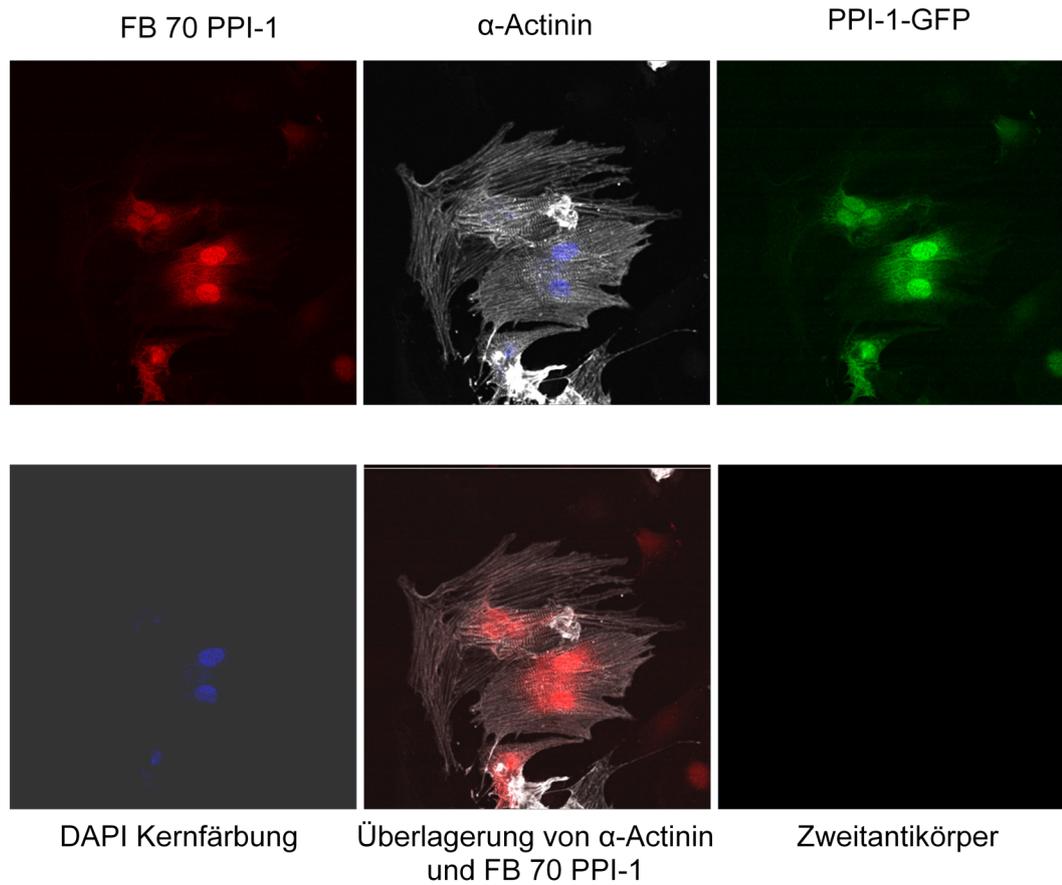
B zeigt die densitometrische Auswertung von A und die Überprüfung der Korrelation zwischen Phospho-PPI-1 mit Phospho-TnI und Phospho-Serin¹⁶-PLB. Die Ordinate oben gibt den Gehalt an Phospho-TnI bezogen auf Gesamt-TnI und unten Phospho-Serin¹⁶-PLB bezogen auf Gesamt-PLB in relativen Einheiten an. Die Abszisse gibt den Gehalt an Phospho-PPI-1 in densitometrischen Einheiten an. Zwischen Phospho-PPI-1 und Phospho-TnI bestand keine Korrelation (Spearman $r=0,28$). Zwischen Phospho-PPI-1 und Phospho-Serin¹⁶-PLB konnte eine signifikante Korrelation gezeigt werden (Spearman $r=0,70$; $p<0,001$).

3.9 Einfluss von Calcineurin auf die Dephosphorylierung von Inhibitor-1

Auf Grund der Erkenntnisse, dass der Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz sowohl in der Proteinkonzentration als auch in seiner Phosphorylierung vermindert war, stellte sich die Frage, wie dieser noch weiter beeinflusst werden kann. Bekannt war, dass der Inhibitor-1 durch die PKA im Herzen phosphoryliert wird, unbekannt hingegen waren die Phosphatasen, die an seiner Inaktivierung beteiligt waren. Hierfür kamen zwei Phosphatasen in Betracht – die Phosphatase-2A und Calcineurin. Die im Herzen vorherrschende Typ 1 Phosphatase ist an der Regulation nicht beteiligt (Shenolikar 1995; Herzig und Neumann 2000). Im Weiteren wurde der Einfluss von Calcineurin auf Inhibitor-1 untersucht.

Hierzu wurden neonatale Kardiomyozyten mit dem Adenovirus GFP-Inhibitor-1 (MOI 3; 48 h) zur Steigerung der Sensitivität infiziert. Vorher musste festgestellt werden, ob das überexprimierte Inhibitor-1 Protein die gleiche Lokalisation und die gleichen Eigenschaften wie das endogene Protein besitzt. Die Lokalisation wurde mittels Immunzytologie (FB70 Inhibitor-1 Antikörper, α -Actinin, DAPI-Kernfärbung) überprüft. Die Inhibitor-1-Threonin³⁵ (PThr³⁵-PPI-1) und Phospholamban-Serin¹⁶ (PSer¹⁶-PLB) Phosphorylierung wurde mittels steigender Isoprenalin-Konzentrationen (0-100 nM) untersucht (Abb. 3.17). Die Blockierung der Inhibitor-1 Threonin³⁵ und Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung wurde mit dem spezifischem PKA Inhibitor H89 (10 μ M, 40 min) überprüft (s. Dissertation Anna Bednorz). Die Immunzytologie zeigte die vorwiegende Lokalisation von Inhibitor-1 im Zytosol, die PKA Phosphorylierung konnte durch den Inhibitor H89 gehemmt und die Phosphorylierung von Inhibitor-1-Threonin³⁵ durch Isoprenalin stimuliert werden (s. Dissertation Anna Bednorz). Die Inhibitor-1 überexprimierenden Zellen wurden mit dem spezifischen Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA; 100 nM; 60 min; n=4) inkubiert, als Positivkontrolle β -adrenerg mit Isoprenalin (ISO; 10^{-9} ; 5min; n=4) stimuliert oder blieben als Kontrolle (Ctr; n=4) unbehandelt. Die Proben wurden geerntet und aus ihnen Proteinhomogenate hergestellt. Die anschließende Western-Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern zeigte, dass die Inkubation neonataler Herzmuskelzellen mit Cyclosporin A zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Inhibitor-1 (Inhibitor-1-Threonin³⁵; 2-6-fach) führte. Da der Inhibitor-1 die Phosphatase-1 beeinflusst und somit nachgeschaltet auch die Phospholamban Phosphorylierung, wurde diese untersucht. Interessanterweise zeigte auch das nachgeschaltete Phospholamban (P-Ser¹⁶-PLB) eine 2-fach gesteigerte Phosphorylierung, obwohl Phospholamban eben kein Substrat von Calcineurin ist (Abb. 3.18).

A



B

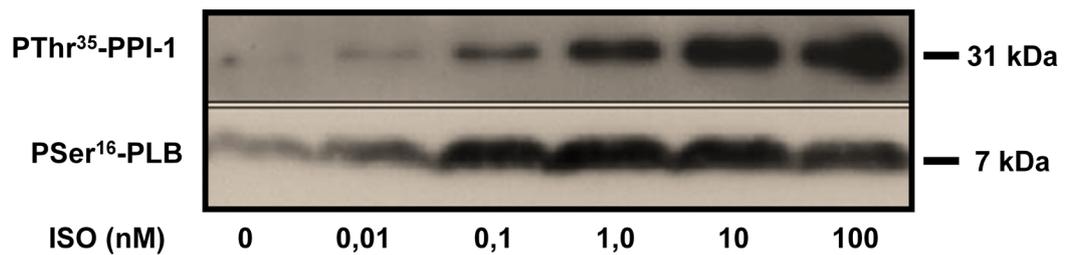


Abb. 3.16 Lokalisation und Charakterisierung von überexprimierten Inhibitor-1.
A: AdGFP-PPI-1 (MOI 3, 48 h) überexprimiert in einer Herzmuskelzelle.
B: Herzmuskelzellen wurden mit AdPPI-1 (MOI 3, 48 h) infiziert und mit Isoprenalin stimuliert. Unterhalb des Westernblots ist die Isoprenalinkonzentration (ISO) in nM angegeben. Rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben.

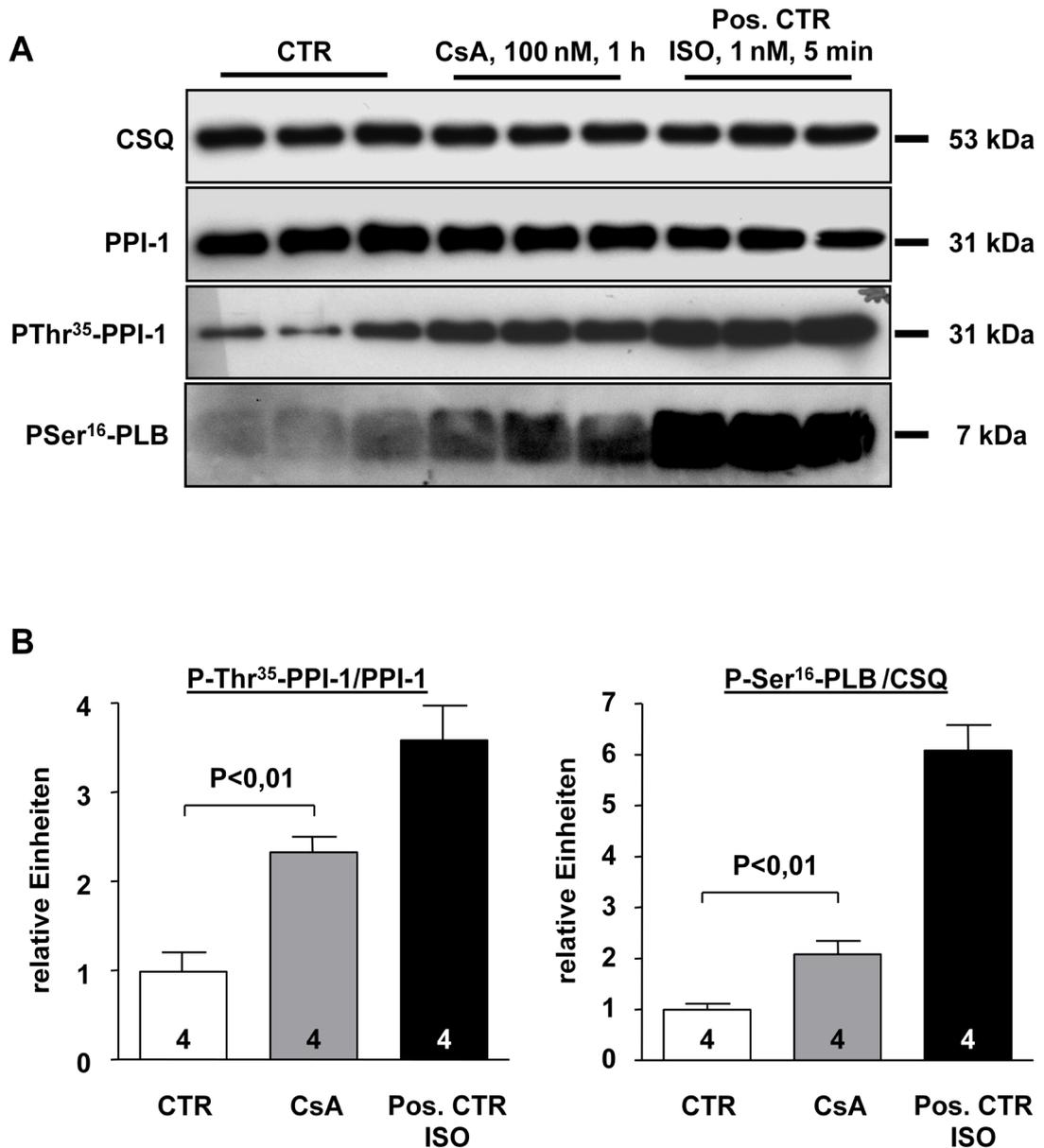


Abb. 3.17 Inhibitor-1-Threonin³⁵ (P-Thr³⁵-PPI-1) und Phospholamban-Serin¹⁶ (P-Ser¹⁶-PLB) Phosphorylierung in Herzmuskelzellen nach 100 nM Cyclosporin A. Die Herzmuskelzellen wurden mit AdGFP/PPI-1 für 48 h infiziert und anschließend mit Cyclosporin A (100 nM) oder als Positivkontrolle mit Isoprenalin (1 nM) behandelt. In A ist der repräsentativen Westernblot dargestellt, rechts sind die Höhe und das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinstandards angegeben. B zeigt die densitometrische Auswertung von A. Die Ordinate in B gibt links den Gehalt an Phospho-Threonin³⁵-PPI-1 bezogen auf Gesamt-PPI-1 und rechts Phospho-Serin¹⁶-PLB bezogen auf Calsequestrin in relativen Einheiten an. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben.

4 Diskussion

Um Aufschluss über eine potentielle pathophysiologische Bedeutung von Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz zu erhalten, sollten in dieser Arbeit die Konzentration und PKA-Phosphorylierung (Aktivität) von Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen untersucht und mit nicht-insuffizienten Spenderherzen verglichen werden. Des Weiteren sollte in isolierten Herzmuskelzellen die Proteinphosphatase, die für die Dephosphorylierung von Inhibitor-1 an der Thr³⁵-Phosphorylierungsstelle verantwortlich ist und somit die PKA-Phosphorylierung funktionell antagonisiert, identifiziert werden.

Folgende Hauptergebnisse wurden erzielt:

1. Die Inhibitor-1 mRNA Menge war in insuffizienten menschlichen Herzen ca. 60% niedriger als in nicht-insuffizienten Herzen.
2. Die immunologische Detektion von Inhibitor-1 Protein war weder histologisch noch in Standard-SDS-Homogenaten möglich.
3. Der Inhibitor-1 konnte mit Hilfe seiner ungewöhnlichen physikalischen Eigenschaften (Hitzestabilität, Säurelöslichkeit) mit Trichloressigsäure aus Gewebe extrahiert und über 500-fach aufkonzentriert werden. Dies ermöglichte die immunologische Detektion im Western Blot.
4. Der Vergleich insuffizienter mit nicht-insuffizienten Herzen ergab, dass die Inhibitor-1 Proteinmenge ca. 60% und die Inhibitor-1 Threonin³⁵ Phosphorylierung ca. 80% in insuffizienten Herzen niedriger war.
5. Die Phosphorylierung des zentralen Ca²⁺-Regulators Phospholamban war in den insuffizienten Herzen ebenfalls vermindert und korrelierte eng mit der Inhibitor-1 Phosphorylierung.
6. Die Hemmung von Calcineurin durch Cyclosporin A führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Inhibitor-1 an der PKA-Stelle.

4.1 Die immunologische Detektion des Protein-Phosphatase Inhibitors-1

Die Inhibitor-1 mRNA Menge war in insuffizienten menschlichen Herzen ca. 60% niedriger als in nicht-insuffizienten Herzen. Es stellte sich daher die Frage, ob auch die Proteinkonzentration verändert ist. Voraussetzung zur Beantwortung dieser Frage wäre jedoch eine sichere immunologische Detektion von Inhibitor-1.

4.1.1 Der Inhibitor-1 Antikörper

Für die Detektion von Inhibitor-1 wurde in dieser Arbeit polyklonales Antiserum gegen das Gesamtprotein generiert. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass das resultierende Antiserum normalerweise gegen mehrere Epitope des Antigens gerichtet ist. Damit erhöht sich aber auch die Gefahr unspezifischer Reaktionen mit gleichartig gestalteten Epitopen anderer Proteine. Der Anti-Inhibitor-1 Antikörper wurde von der Firma Eurogentec (Brüssel, Belgien) hergestellt.

Rekombinanter bzw. in Kardiomyozyten adenoviral überexprimierter Inhibitor-1 konnte mit Hilfe dieses Antiserums immunologisch eindeutig detektiert werden. Diese wurden daher als Referenz für die Untersuchungen im menschlichen Herzgewebe verwendet. Bei der Untersuchung menschlicher Herzhomogenate detektierte der Antikörper in der Tat im Western Blot eine prominente Bande bei 29 kDa. Dieses Ergebnis entsprach der von Carr et al. publizierten Höhe von Inhibitor-1 im menschlichen Herzen (Carr 2002) und lag ungefähr auf der Höhe von Inhibitor-1 der Ratte (30 kDa; Mc Dougall 1989). Jedoch zeigte sich kein Unterschied der Proteinmenge von Inhibitor-1 zwischen insuffizienten und Kontrollherzen (s. Abb. 3.2). Bemerkenswert hierbei war die ungewöhnlich niedrige Varianz der Bandenintensität innerhalb der Gruppen. Gerade in menschlichen Herzproben wäre dies, in Anbetracht der unterschiedlichen bzw. unbekanntenen Daten (z.B. Stadium der Herzinsuffizienz, Alter, Medikamente, Art der Gewinnung) und der größeren Varianz der ermittelten mRNA Menge, zu erwarten gewesen. Dieses Ergebnis könnte zum einen bedeuten, dass es trotz der veränderten mRNA Menge zu keiner Beeinflussung der Proteinkonzentration von Inhibitor-1 bei Herzinsuffizienz kommt oder zum anderen, dass die detektierte Bande bei 29 kDa einfach unspezifisch war.

Dass es sich bei der 29 kDa Bande in Proteinhomogenaten menschlicher Herzen um eine unspezifische Antikörperbindung handeln könnte und nicht um Inhibitor-1, wurde durch das Ergebnis zweier anderer Gruppen gestützt. Diese zeigten, dass eine Detektion von Inhibitor-1 nur nach Anreicherung aus relativ viel Gewebe möglich war (1 komplettes Herz vom Meerschweinchen; Neumann 1991; Gupta 1997). Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden die Blots mit Präimmunserum inkubiert. In der Tat wurde auch mit

Präimmunserum eine Bande in der gleichen Höhe (29 kDa) detektiert. Dieser Befund bewies, dass es sich bei der 29 kDa Bande in den SDS-Standardhomogenaten menschlicher Herzen um eine unspezifische Reaktion handelte.

Für eine unspezifische Reaktion unseres Antikörpers sprachen auch die Ergebnisse unserer immunzytologischen Untersuchungen an Kardiomyozyten. Hierbei färbten sich nach Inkubation mit dem Anti-Inhibitor-1 Antikörper die Z-Banden des Sarkomers (s. Abb. 3.4). Dieses Signal war mit hoher Wahrscheinlichkeit unspezifisch, da der Inhibitor-1 ein zytosolisches Protein ist (Huang und Glinsmann 1976; Iyer 1988; eigene Befunde in Kardiomyozyten, die Inhibitor-1 adenoviral überexprimierten). Eine Lokalisation von Inhibitor-1 an der Z-Bande des Sarkomers bzw. einer anderen Zellstruktur wurde bisher nicht beschrieben und war eher unwahrscheinlich.

Der Antikörper lag bis zu diesem Zeitpunkt nur in unaufgereinigtem Zustand vor. Um unspezifische Reaktionen zu verringern, wurde das Antiserum mit Hilfe rekombinanten Inhibitor-1 Proteins affinitätsgereinigt. Mit diesem aufgereinigten Antiserum wurden die Experimente wiederholt. Es zeigte sich zwar eine Verringerung der unspezifischen Banden im Western Blot, aber die unspezifische Bande in der Höhe von 29 kDa wurde ebenfalls nach Affinitätsaufreinigung detektiert (s. Abb. 3.7).

In der Immunzytologie hingegen verschwand nach der Aufreinigung die Reaktion mit der Z-Bande, aber es war kein Signalunterschied zwischen Präimmunserum und Antikörperserum erkennbar (s. Abb. 3.8). Somit war eine Detektion von endogenem Inhibitor-1 mit diesem Antikörper in der Immunzytologie nicht möglich.

Um das Antiserum weiter zu charakterisieren, nutzten wir Herzgewebe von Inhibitor-1 KO-Mäusen, das uns freundlicherweise von Dr. L. Kranias (Cincinnati, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Vereinbar mit der Vermutung, dass die detektierte Bande bei 29 kDa unspezifisch war, stellte sich die gleiche Bande auch im Western Blot von KO-Gewebe dar (s. Abb. 3.10).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass es nicht möglich war, das Inhibitor-1 Protein in SDS-Standardhomogenaten mittels Western Blot zu detektieren. Die Befunde könnten entweder mit einer schwachen Bindung des Antikörpers für Inhibitor-1, einer unspezifischen Reaktion, die zur Überlagerung von Inhibitor-1 führt oder mit einer zu geringen Konzentration von Inhibitor-1 erklärbar sein.

Um zu überprüfen, ob das Antiserum das Problem darstellt, wurde uns ein weiterer Inhibitor-1 Antikörper (G184) von Dr. Greengard (New York, USA) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper war ebenfalls ein polyklonaler Inhibitor-1 Gesamtantikörper und wurde

von Carr et al. (2002) bei dessen Untersuchungen von Inhibitor-1 in menschlichen Herzen eingesetzt. Dieser Antikörper zeigte sowohl in den SDS-Standardhomogenaten als auch in der Immunzytologie jedoch das gleiche (Banden-) Muster wie der von uns generierte und aufgereinigte Antikörper (s. Abb. 3.7–3.10). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass einerseits die Proteinkonzentration von Inhibitor-1 in einer zu geringen Konzentration für die Detektion im Western-Blot vorliegen könnte oder der Inhibitor-1 Antikörper eine niedrige Affinität gegenüber dem Protein aufweist.

Daher wurde als nächster Schritt versucht, das Inhibitor-1 Protein anzureichern und mit dem aufgereinigten Inhibitor-1 Antikörper zu detektieren. Um eine Anreicherung zu erreichen, standen zwei Möglichkeiten zur Wahl, einerseits die Anreicherung über eine Immunpräzipitation und andererseits mit Hilfe der physikalischen Eigenschaften über eine Trichloressigsäure-Fällung.

4.1.2 Versuch der Anreicherung von Inhibitor-1 mit Hilfe der Immunpräzipitation

Als erstes wurde versucht, das Inhibitor-1 Protein über eine Immunpräzipitation anzureichern und störende Proteine zu entfernen. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation zeigten, dass es zwar zu einer Anreicherung von Proteinen kam, jedoch gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Inhibitor-1 Detektion. Die unspezifische Bande bei 29 kDa wurde durch die Immunpräzipitation ebenfalls angereichert. Im Westernblot stellte sich die Bande sowohl mit dem Inhibitor-1 Antikörper als auch mit dem Präimmenserum dar (s. Abb. 3.11). Der Vorteil einer Immunpräzipitation ist zwar, dass durch die Bindung an den Antikörper eine spezifische Anreicherung des gewünschten Proteins erreicht werden kann, zeigt aber ebenfalls den größten Nachteil dieser Methode auf. Der Erfolg der Immunpräzipitation hängt sehr stark vom verwendeten Antikörper und dessen Spezifität und Affinität zum Antigen ab. Aus diesem Grund könnten eine geringe Konzentration von Inhibitor-1 Protein und/oder eine geringe Affinität des Antikörpers dazu führen, dass eine spezifische Detektion von Inhibitor-1 durch eine Immunpräzipitation ebenfalls nicht möglich ist. Die ungenügende Spezifität unseres Antikörpers zeigte sich, indem dieser das Protein, welches zur Bande bei 29 kDa im Western-Blot führt, ebenfalls präzipitiert. Dies könnte dazu führen, dass eine mögliche spezifische Bande in der Höhe von 29 kDa von dieser unspezifischen Bande im Western Blot überlagert wird. Eine weitere Einschränkung dieser Methode ist, dass Proteine an den sogenannten *Beads* direkt binden können und somit ebenfalls separiert werden. Auch der Test verschiedener Protokolle, um störende Einflüsse wie zu hohe Salzkonzentrationen bzw. ungeeignete pH-Werte zu verringern, zeigten keine positiven Ergebnisse. Eine weitere wichtige Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine zu geringe Konzentration von Inhibitor-1 sein, sodass die

eingesetzte Menge an Gesamtprotein (20-50mg) für die Immunpräzipitation und anschließende Detektion von Inhibitor-1 Protein nicht ausreichend war.

4.1.3 Anreicherung von Inhibitor-1 mittels Trichloressigsäure-Extraktion

Es wurde nun mit Hilfe der besondern physikalischen Eigenschaften versucht, das Inhibitor-1 Protein anzureichern und somit eventuell im Western Blot sichtbar zu machen. Die besonderen Eigenschaften von Inhibitor-1 sind die Hitzestabilität und die Säurelöslichkeit (Huang und Glinsmann 1976). Dies bedeutet, dass Inhibitor-1 bei einer geringen Trichloressigsäure-Konzentration (1,5%) im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen nicht gefällt wird. Erst bei einer höheren Konzentration von 19% fällt das Inhibitor-1 Protein aus. Anschließend wurden aus diesem Extrakt durch Kochen die hitzelabilen Proteine entfernt (Foulkes 1980; Kathra 1980; Neumann 1991).

Für diese Extraktion wurde 1 g Gewebe benötigt, um 200 µg Trichloressigsäure-Extrakt zu erhalten. Die Überprüfung von 7 µg Extrakt zeigte im Western Blot eine spezifische Bande auf einer Höhe von 29 kDa bei Extrakten der Ratte und 26 kDa bei Extrakten von Mensch und Kaninchen. Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen Größen (Nimmo 1982; MacDougall 1989). Das menschliche Inhibitor-1 Protein migrierte im SDS-Gel (s. Abb. 3.12 B) ähnlich dem des Kaninchens (Nimmo 1982). Die unspezifische Bande bei 29 kDa war in den Extrakten nicht mehr darstellbar (s. Abb. 3.12 A).

Um zu überprüfen, ob das Signal wirklich spezifisch ist, wurde mit Präimmunserum und Antikörper der mit rekombinanten Inhibitor-1 vorinkubiert war getestet. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die detektierten Banden in der Höhe von 26 kDa (Mensch und Kaninchen) bzw. 29 kDa (Ratte) spezifisch waren (s. Abb. 3.12). Durch diese Erkenntnisse muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei der durch Carr et al. (2002) detektierten Bande mit dem G184 Anti-Inhibitor-1 Antikörper in den Proteinhomogenaten um eine unspezifische Reaktion handelte.

Abschließend zeigten die Ergebnisse der Aufkonzentration, dass das Inhibitor-1 Protein prinzipiell detektiert werden kann, aber dies nur nach einer Trichloressigsäure-Extraktion möglich ist. Diese Ergebnisse der schwierigen Detektion in Standardhomogenaten wurden nachfolgend durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Rodriguez 2007; Nguyen 2007).

Dieser Befund ließ die weitere Untersuchung von endogenem Inhibitor-1 Protein in insuffizienten Herzen zu. Aber es stellte sich die Frage, ob Inhibitor-1 bei solch einer geringen Konzentration überhaupt eine wichtige Rolle im Herzen spielen kann? Man könnte argumentieren, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass ein Protein wie Inhibitor-1, welches erst 500-fach angereichert werden muss, um immunologisch detektiert zu werden, eine wichtige Rolle spielt. Allerdings ist der Inhibitor-1 im phosphorylierten Zustand sehr potent gegenüber der Phosphatase-1 (IC_{50} 1 nM; Endo 1996). Hieraus ergab sich die wichtige Frage, ob die Proteinkonzentration von Inhibitor-1 in menschlichen Herzen mindestens 1 nM erreicht. Dies wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen solcher Extrakte parallel zu rekombinanten Inhibitor-1 Protein ermittelt (s. Abb. 3.13). Diese Untersuchung ergab, dass die Inhibitor-1 Konzentration in linken Ventrikeln mit ~120 nM deutlich über der IC_{50} (~1 nM) liegt und somit ausreichend ist, um die kardiale Phosphatase-1 effizient zu hemmen. Diese Erkenntnisse rechtfertigten somit die weitere Untersuchung von Inhibitor-1 in menschlichen Herzen.

4.2 Der Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen

Der Vergleich von gekochten Extrakten aus kranken und nicht-insuffizienten menschlichen Herzen ergab, dass die Inhibitor-1 Proteinmenge (-57%) und der PKA-Phosphorylierungsgrad (-72%) in insuffizientem Myokard stark erniedrigt sind (Abb. 3.15). Interessanterweise konnte zuvor gezeigt werden, dass die Phosphatase-1-Aktivität in Vesikeln des SR in insuffizientem menschlichen Myokard erhöht (Neumann 1997) und die Phosphorylierung von Phospholamban vermindert ist (Bartel 1996). Eine mögliche Erklärung hierbei könnte die Inhibitor-1 Downregulation spielen, da dieser nach der PKA-Aktivierung die Phosphatase-1 hemmt, wodurch es zur Erhöhung der Phospholamban-Phosphorylierung kommt. Eine reduzierte Inhibitor-1-Menge oder -Aktivität könnte somit zu den Veränderungen in der chronischen menschlichen Herzinsuffizienz beitragen. Diese Befunde konnten im Tiermodell der Isoprenalin-induzierten Herzhypertrophie bestätigt werden (Boknik 2000, El-Armouche 2007). Die Zusammenhänge werden weiter unten ausführlich diskutiert.

4.2.1 Problematik der menschlichen Herzproben

Die Gewinnung und Einordnung von menschlichen Herzen zur Untersuchung von Proteinen und deren Phosphorylierung ist problematisch.

Die verwendeten insuffizienten Herzen, die im Rahmen einer Herztransplantation gewonnen wurden, konnten optimal gelagert und schnell verarbeitet werden. Für unsere

Studie wurden Herzproben von Patienten (n=21; Alter: 33-66 Jahre; Geschlecht: 19 x männlich, 2 x weiblich) mit ischämischer (n=9) und dilatativer (n=12) Kardiomyopathie verwendet. Die Einteilung in die verschiedenen Stadien der Herzinsuffizienz erfolgte nach den klinischen Parametern der NYHA. Es wurden nur Herzen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz der Stadien III-IV verwendet. Die Medikation war bei den 21 Patientenproben meist gut dokumentiert (Details siehe Tabelle 3.1 und 3.2) und beinhaltete ACE-Hemmer (n=11), Kalzium-Kanal Blocker (n=7), Diuretika (n=17), Herzglykoside (n=13), Nitrate (n=16) und Katecholamine (n=2). Keiner der Patienten erhielt β -Adrenozeptorblocker.

Sehr viel schwieriger ist die Beschaffung und Auswahl von „Kontrollherzen“. Die Auswahlmöglichkeit ist stark eingeschränkt, da diese Herzen nur sehr begrenzt zur Verfügung stehen. Die Grundlage für die Auswahl als Kontrolle war die normale systemische Herzleistung vor dem Tode. Für diese Studie standen nach diesem Kriterium 9 nicht-insuffiziente Herzproben (Alter: 19-52 Jahre; Geschlecht: 8 x männlich, 1 x weiblich) zur Verfügung. Die Todesursachen waren Schädel Hirn Traumen (n=4) und Gehirnblutungen (n=5). Hierbei war zu beachten, dass oftmals ein längerer Zeitraum vom Hirntod des Spenders bis zur Probenasservation verging. Von den Spendern verwendete Medikamente waren unbekannt. Somit stellt sich die wichtigste Frage bei dem Umgang mit diesen menschlichen Herzproben, wie wird eine Kontrolle definiert und ist unser Kriterium für unsere Studie ausreichend. In Tiermodellen ist die Definition der Kontrolle meist kein Problem, da hier der genetische Hintergrund und weitere beeinflussende Faktoren klar definiert werden können. Aber im Umgang mit menschlichen Herzproben ist dies meist nicht der Fall. Es gibt hierbei bekannte und unbekannt Variablen, die bei der Beurteilung der Herzproben beachtet werden müssen. Das Patientenalter, Geschlecht, die Pharmakotherapie sind z.B. Variablen, die einen Einfluss auf die Herzmuskelbiologie haben. All diese Gesichtspunkte müssen beim Einschließen von Kontrollen beachtet werden. Die Ergebnisse unserer vergleichenden Analyse von Kontrollen und kranken Herzen müssen im Bewusstsein dieser möglichen Störgrößen interpretiert werden (Jweied 2007).

4.2.2 Inhibitor-1 in der chronischen menschlichen Herzinsuffizienz

4.2.2.1 mRNA Menge von Inhibitor-1

Bei der Untersuchung der Genexpression von Inhibitor-1 an menschlichen Herzen konnte gezeigt werden, dass die auf GAPDH normalisierte mRNA-Menge in insuffizienten Herzen um ~60% vermindert ist. Kritisch muss nach den neuen Daten von Pilbrow et al. (2008)

hierbei die Wahl der GAPDH zur Normalisierung der mRNA Menge und dem nachfolgenden Vergleich insuffizienter mit nicht-insuffizienten Herzen betrachtet werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die mRNA Menge der GAPDH in der Herzinsuffizienz nicht expressionsstabil genug ist, um Beeinflussungen vergleichender Analysen auszuschließen. Wie hoch diese mögliche Beeinflussung unserer Ergebnisse war, kann nachfolgend auf Grund der Verfügbarkeit der verwendeten Proben nicht mehr überprüft werden.

Beachtet werden muss, dass die hier festgestellte Verminderung der mRNA Menge einen stationären Zustand beschreibt. Gründe für diese Abnahme könnte einerseits der vermehrte Abbau oder andererseits eine verminderte Expression sein. Um den Grund für diese Abnahme zu untersuchen, müssten Promotorstudien durchgeführt werden. Diese wurden nicht durchgeführt. Sehr wahrscheinlich ist aber, dass die Ursache für die verminderte Inhibitor-1 mRNA-Menge in der chronischen Aktivierung der β -Adrenozeptoren zu finden ist. Hierfür spricht einerseits die verminderte mRNA-Menge der β -Adrenozeptoren um ~50% (Bristow 1982; Böhm 1988) in der Herzinsuffizienz und andererseits die Daten eines Tiermodells, in welchem es durch Dauerstimulation der β -Adrenozeptoren mit Isoprenalin zu einer Verminderung der Inhibitor-1 mRNA Menge um ~30% kam (El-Armouche 2007). Es stellte sich anschließend die Frage, ob die Abnahme der Inhibitor-1 mRNA-Menge mit der Proteinmenge, ähnlich dem der β -Adrenozeptoren, in der Herzinsuffizienz korreliert.

4.2.2.2 Proteinkonzentration von Inhibitor-1

Die Überprüfung der endogenen Proteinkonzentration in menschlichen Herzen wurde erst durch die eindeutige immunologische Detektion von Inhibitor-1 im Western Blot möglich. Unsere Ergebnisse zeigten, dass sowohl die mRNA-Menge als auch die Proteinkonzentration von Inhibitor-1 in insuffizienten Herzen deutlich verringert ist (s. Abb. 3.1 und 3.15). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Daten von Carr et al. (2002), welche keinen Unterschied der Proteinmenge in insuffizienten Herzen feststellen konnten. Diese unterschiedlichen Daten sind auf die unterschiedliche Detektion von Inhibitor-1 zurückzuführen. Bei Carr et al. wurde die 29 kDa Bande, welche in SDS-Standardhomogenaten im Western Blot auftrat, als Inhibitor-1 spezifisch angenommen und ausgewertet. Hierbei zeigte sich keine Veränderung (s. Abb. 3.2). Hingegen wurde von uns gezeigt, dass es sich bei dieser Bande eben nicht um Inhibitor-1, sondern um eine unspezifische Reaktion handelte (s. 4.1). Unsere Daten hingegen beruhten auf der Auswertung des Inhibitor-1 in den Extrakten, wodurch sich dieser Unterschied der Ergebnisse erklären lässt.

Für die Funktion von Inhibitor-1 war aber nicht nur die Gesamtproteinkonzentration, sondern vor allem auch der Phosphorylierungszustand und damit auch der Aktivitätszustand von Inhibitor-1 entscheidend. Durch die Trichloressigsäure-Proteinfällung bleibt die Phosphorylierung der Proteine erhalten und kann somit ebenfalls untersucht werden (Foulkes 1980; Kathra 1980; Neumann 1991). Die Untersuchung zeigte, dass die Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ in insuffizienten Herzen stark vermindert war (s. Abb. 3.15). Aufgrund der Trichloressigsäure-Fällung gingen bei Herzinsuffizienz unveränderte Vergleichsproteine, wie Calsequestrin, verloren. Somit war der Bezug auf ein Vergleichsprotein als Bezugsgröße nicht mehr möglich. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden alle Versuchsbedingungen gleich gehalten (z.B. Ausgangsmaterial und -menge). Nach der Fällung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um die gleiche Menge an Extrakt aufzutragen. Zur Überprüfung der gleichen Beladung wurde eine Ponceau, eine Coomassie und eine Silbernitrat Färbung angefertigt (s. Abb. 3.14). Unter Berücksichtigung dieser Kriterien konnte von einer Vergleichbarkeit der Proben ausgegangen werden, wodurch eine korrekte Auswertung möglich wurde.

4.2.2.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Experimente zeigten, dass die Inhibitor-1 mRNA Menge in insuffizienten Herzen um 50% reduziert ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte später zeigen, dass eine chronische Isoprenalin-Infusion im Tiermodell (Ratte) ebenfalls zu einer Herunterregulation der Inhibitor-1 mRNA Konzentration, allerdings nur um 30%, führt (El-Armouche 2007). Diese Daten zeigen, dass die mRNA Menge von Inhibitor-1 ähnlich der mRNA Menge der β -Adrenozeptoren in der Herzinsuffizienz vermindert ist. Die Verminderung der Proteinkonzentration von Inhibitor-1 um ca. 60% ist im Vergleich zu anderen veränderten Proteinen in der Herzinsuffizienz groß. Andere gut untersuchte Proteine zeigen nur eine Verminderung der Konzentration von 25-50% (z.B. β_1 -Adrenozeptoren; Bristow 1982; Böhm 1988). Die Phosphorylierung von Inhibitor-1 ist in kranken Herzen noch drastischer vermindert (ca. 80%). Dieses Ergebnis ist am ehesten auf die Desensitivierung der β -adrenergen Signalkaskade zurückzuführen. Hierbei verringert sich die cAMP Konzentration, was nachfolgend zu einer verminderten PKA Aktivierung führt (Lohse 2003; El-Armouche 2003 und 2008; Eschenhagen 2008). Eine weitere Rolle für die Abnahme der Inhibitor-1 Phosphorylierung könnte eine vermehrte Dephosphorylierung des Inhibitor-1 durch Calcineurin spielen (Molkentin 1998; s. 4.3).

4.2.3 Untersuchung von Phosphatase-1, Troponin-I und Phospholamban

Auf Grund der starken Regulation von Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz wurden noch weitere Zielproteine untersucht. Hierfür wurden von den gleichen Herzen Gesamtproteinhomogenate hergestellt. Die Untersuchung der Proteinkonzentration der Phosphatase-1, von Troponin-I und seiner Phosphorylierung ergab keine Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Herzen (s. Abb. 3.16). Die unveränderte Phosphatase-1 Konzentration stand im Einklang mit der unveränderten globalen Proteinkonzentration (Neumann 1997).

Der überraschende Befund einer unveränderten Troponin-I Phosphorylierung ist schwierig einzuordnen, da Troponin-I wie auch Phospholamban ein Substrat der PKA ist. Die Phosphorylierung von Troponin-I kann experimentell durch die Hemmung von Phosphatasen erhöht werden (Neumann 1995; Boknik 2001). Bei der Phosphorylierung von Troponin-I könnte somit die Phosphatase-1 und dadurch auch der Inhibitor-1 eine mögliche Rolle spielen. Allerdings wurde in Studien mit insuffizienten menschlichen Herzen eine basale Verminderung der Troponin-I Phosphorylierung gefunden (Bodor 1997; Zakhary 1999), während andere herausfanden, dass die Troponin-I Phosphorylierung in insuffizienten menschlichen Herzen (Bartel 1996) und im Tiermodell (Boknik 2000) unverändert ist. Die basale Phosphorylierung ist bekanntermaßen abhängig von den experimentellen Bedingungen, was die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise erklären könnte. Neuere Daten zeigen, dass Troponin-I an der PKA Phosphorylierungsstelle Serin^{23/24} mehrfach phosphoryliert werden kann. Die neu entdeckte Proteinkinase D (Murphy 2004) phosphoryliert Troponin-I ebenfalls an Serin^{23/24}. Eine solche zusätzliche Phosphorylierung könnte eine Erklärung unsere Daten sein. Aber es wurde gezeigt, dass eine Hemmung der Proteinkinase D zu einer verminderten Phosphorylierung von Troponin-I an Serin^{23/24} führt (Murphy 2004). Hieraus ergab sich eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unveränderte Phosphorylierung von Troponin-I. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde bei Murphy et al. ein spezifischer Troponin-I-Serin^{23/24} Antikörper verwendet. Der von uns verwendete -PKA-phospho spezifische Troponin-I Antikörper (Firma HyTest, Turku) erkennt das Phospho-Motiv ArgXaaXaaSer/Thr, welches für viele PKA Zielproteine die Phosphorylierungsstelle darstellt (Cuello 2007). Dieser Antikörper wurde kommerziell durch Immunisierung einer Maus mit PKA-phosphorylierten kardialen Troponin-I hergestellt. Die Überprüfung, ob dieser eine PKA Phosphorylierung von Troponin-I erkennt, erfolgte an isolierten Kardiomyozyten, welche mit rekombinanter PKA inkubiert wurden (Cazorla 2006). Trotz des eindeutigen Nachweises, dass der Antikörper eine PKA Phosphorylierung erkennt, zeigte dieser in verschiedenen Studien, wie auch in unseren Experimenten, keine

Veränderung der Phosphorylierung von Troponin-I in der Herzinsuffizienz (Boknik 2000; El Armouche 2004). Hingegen zeigen phosphospezifische Troponin-I Antikörper gegen die Phosphorylierungs-stelle Serin^{23/24} (Firma Cell Signaling, Danvers) eine verminderte Troponin-I Phosphorylierung (Cuello 2007; El-Armouche 2007; Messer 2007). Diese Daten deuten darauf hin, dass es neben der PKA/PKD abhängigen Serin^{23/24} Phosphorylierungsstelle noch eine weitere PKA Phosphorylierungsstelle gibt. Diese zusätzliche Phosphorylierungsstelle wird durch den spezifischen Serin^{23/24} Antikörper aber nicht erkannt. An Herzproben von Hunden, bei denen eine Herzinsuffizienz induziert wurde, wurden beide Antikörper getestet (El-Armouche 2007). Der von uns getestete Antikörper zeigte hier ebenfalls keine Veränderung der Troponin-I Phosphorylierung. Hingegen zeigte der spezifische Serin^{23/24} Troponin-I Antikörper eine Verminderung der Phosphorylierung in Homogenaten insuff. Herzen. In diesem Zusammenhang müssten unsere Ergebnisse anders beurteilt werden. Die von unserem Antikörper bevorzugt erkannte Phosphorylierungsstelle ist vielleicht sensitiver für die PKA, aber nicht hypophosphoryliert. Eine nachträgliche Überprüfung unserer menschlichen Proben mit dem Serin^{23/24} spezifischen Troponin-I Antikörper würde möglicherweise zu anderen Ergebnissen führen. Der unterschiedliche Einsatz von Troponin-I Antikörpern würde die Diskrepanz unserer Daten und der neueren Daten von Messer et al. erklären. Messer et al. (2007) fand mittels des spezifischen Troponin-I Serin^{23/24} Antikörpers eine verminderte Phosphorylierung von Troponin-I in Homogenaten insuffizienter Herzen.

Die ebenfalls durchgeführte Untersuchung von Phospholamban ergab einen interessanten Befund. Es wurde eine Korrelation zwischen der Verminderung von Inhibitor-1 und dessen Phosphorylierung mit der Verminderung der Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung gefunden (s. Abb. 3.16). Dieser Zusammenhang zwischen einer verminderten Proteinkonzentration/Phosphorylierung von Inhibitor-1 und der Phospholamban-Phosphorylierung wurde in einem Herzinsuffizienz-Tiermodell mit chronischer Isoprenalin-Stimulation bestätigt (El-Armouche 2007). Phospholamban ist ein wichtiger Regulator der kardialen Kontraktilität (Koss 1996). Es kontrolliert die Ca²⁺ Aufnahme über die SERCA und inhibiert diese im nicht-phosphorylierten Zustand. Die PKA abhängige Phosphorylierung löst diese Inhibition auf. Die Phosphatase-1 abhängige Dephosphorylierung von Phospholamban hingegen bewirkt eine verminderte Ca²⁺ Rückresorption in das SR, reduziert die systolische Ca²⁺ Freisetzung und erhöht somit das diastolische Ca²⁺. Letzteres würde dazu führen, dass es zu einer Ca²⁺ vermittelten Aktivierung von Calcineurin kommt, welche durch seine Aktivierung dazu führen könnte, dass der Inhibitor-1 dephosphoryliert wird (s. 4.3). Dies könnte einerseits bedeuten, dass

ein Circulus vitiosus beschleunigt wird, aber andererseits könnte dies als Schutzmechanismus gegen die β -adrenerge Überstimulation interpretiert werden.

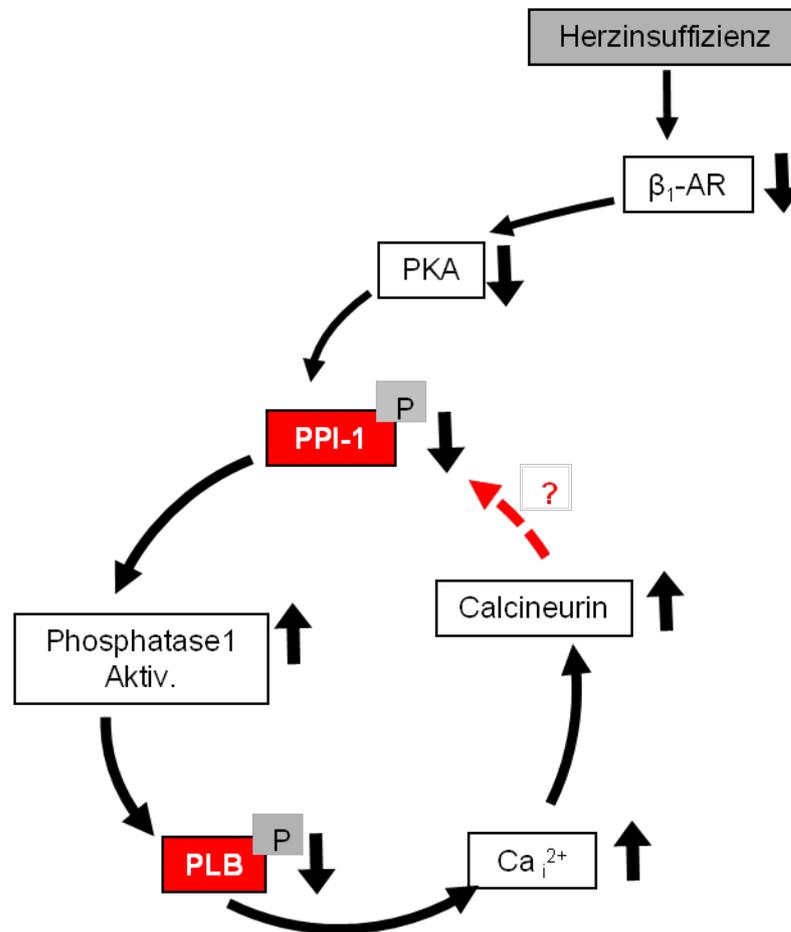


Abb. 4.1 Schema eines möglichen Circulus vitiosus

In der Herzinsuffizienz ist die Zahl der β -Adrenozeptoren vermindert. Dies führt dazu, dass die Proteinkinase A (PKA) vermindert aktiviert und dadurch der Inhibitor-1 weniger phosphoryliert wird. Nachfolgend ist die Aktivität der am SR assoziierten Phosphatase-1 erhöht, wodurch die Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung vermindert wird. Hierdurch wird das intrazelluläre Kalzium (Ca_i^{2+}) erhöht, welches Calcineurin aktiviert und dieses wiederum dephosphoryliert den Inhibitor-1 wodurch ein Circulus vitiosus entsteht.

4.2.4 Einordnung unserer Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse implizieren, dass die verminderte Inhibitor-1 Konzentration und Phosphorylierung zu einem Wirkverlust von Katecholaminen bei der Herzinsuffizienz beitragen könnten. Hierdurch würden wiederum die systolische und diastolische Funktion und die Inotropie nach β -adrenerger Stimulation vermindert. Der Inhibitor-1 würde sich somit in die Kette der β -adrenergen Desensitivierung einreihen. Die Hypothese der Verminderung von Inhibitor-1 als Schutzmechanismus gegen β -adrenerge Überstimulation wird durch Inhibitor-1 KO-Mäuse untermauert. Diese haben eine normale

Herzstruktur (Carr 2002; El-Armouche 2008) und zeigen eine leichte Desensitivierung gegenüber β -adrenerger Stimulation, wobei die maximale kontraktile Antwort nach Stimulation unverändert ist (El-Armouche 2008). Weiterhin sind Inhibitor-1 KO-Mäuse teilweise vor Hypertrophie und Arrhythmien nach pathologischer β -adrenerger Stimulation geschützt (El-Armouche 2008). Die hier dargestellten Befunde deuten darauf hin, dass Inhibitor-1 ein pathophysiologisch ungünstiges Element der β -adrenergen-Signalkaskade und seine Herunterregulation bei chronischer Herzinsuffizienz protektiver Natur ist. Andererseits wurde in einem Überexpressionsmodell mit einem verkürzten konstitutiv aktiven Inhibitor-1 (Inhibitor-1c) gezeigt, dass es unter basalen Bedingungen zur Ausbildung eines hyperkontraktilen Phänotyps kommt und nach chronischer Drucküberlastung bestehen bleibt (Pathak 2005). Dies steht im Widerspruch zu den KO Daten. Die Erklärung für diese Unterschiede könnte in der unterschiedlichen Struktur und Funktion von WT-Inhibitor-1 und Inhibitor-1c liegen. Der Inhibitor-1c ist konstitutiv aktiv, dies bedeutet, dass dieser nicht über die PKA an Threonin³⁵ aktiviert werden muss, um die Phosphatase-1 zu hemmen (Endo 1996). Weiterhin fehlt dem Inhibitor-1c gegenüber dem WT-Inhibitor-1 die PKC α Phosphorylierungsstelle (Serin⁶⁷) welche für die Verminderung seiner Aktivität gegenüber der Phosphatase-1 verantwortlich ist (Rodriguez 2007). Es war bekannt, dass die PKC α abhängige Regulation von Inhibitor-1 mit einer verminderten kontraktile Funktion assoziiert ist (Braz 2004). Ein weiterer Unterschied liegt in der Affinität von Inhibitor-1c zur Phosphatase-1, welcher erheblich niedriger ist als die Affinität des phosphorylierten WT-Inhibitor-1 (Endo 1996). Die geringe Affinität von Inhibitor-1c zur Phosphatase-1 könnte diesen zu einem partiellen Agonisten machen, der einerseits das System im basalen Zustand durch Hemmung der Phosphatase-1 stimuliert und andererseits bei katecholaminerger Stimulation durch Konkurrenz mit dem endogenen aktivierten Inhibitor-1 hemmt. Diese Untersuchungen zeigen, dass der Inhibitor-1c nicht das funktionelle Gegenteil von WT-Inhibitor-1 darstellt.

Es ist nicht ganz klar, wie sich diese scheinbar gegensätzlichen Erkenntnisse in die Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz und der Entwicklung möglicher neuer Therapiestrategien einordnen lassen. Dies ist zurzeit aber Gegenstand der weiteren Forschung.

4.3 Der Einfluss von Calcineurin auf die Threonin³⁵ Phosphorylierung von Inhibitor-1

Die Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ erfolgt durch die Proteinkinase A (PKA). Dies führt über die Hemmung der Phosphatase-1 zu einer Verstärkung des β -Adrenozeptoren/cAMP/PKA Signalweges, welche dazu führt, die Dephosphorylierung von

verschiedenen PKA Substraten zu hemmen. Allerdings war nicht bekannt, welche Phosphatase Inhibitor-1 im Herzen an der Threonin³⁵ Phosphorylierungsstelle wieder dephosphoryliert. Hierfür kamen zwei Phosphatasen in Betracht – die Phosphatase-2A und Calcineurin. Diese Arbeit beschränkte sich auf Calcineurin. Calcineurin wird durch Ca^{2+} aktiviert. In der Herzinsuffizienz ist das diastolische Ca^{2+} erhöht, sodass es zur Aktivierung von Calcineurin kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Calcineurinüberexpression in transgenen Mäusen zur Herzhypertrophie und anschließend zur Herzinsuffizienz führt (Molkentin 1998). Sowohl im Herzinsuffizienz-Tiermodell (Sussman 1998, Lim 2000) als auch in der menschlichen Herzinsuffizienz (Lim 1999, Haq 2001, Ritter 2002) wurde eine erhöhte Calcineurinmenge und Aktivität nachgewiesen. Diese Befunde zeigen, dass Calcineurin eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz spielt (Molkentin 2004). Calcineurin stellt somit einen interessanten Interaktionspartner für den Inhibitor-1 dar, da der Inhibitor-1 über Calcineurin und die PKA einen potentiell wichtigen *cross talk* zwischen dem cAMP- und Ca^{2+} -Signalweg im Herzen vermitteln könnte.

4.3.1 Auswahl und Problematik der verwendeten Methoden

Der Einfluss von Calcineurin auf die Inhibitor-1 Threonin³⁵ Phosphorylierung wurde durch die selektive Hemmung von Calcineurin durch Cyclosporin A (Kunz 1993) untersucht. Als Modell dienten neonatale Kardiomyozyten aus Rattenherzen, in welchen Inhibitor-1 adenoviral überexprimiert wurde. Folgende methodischen Probleme sind dabei zu berücksichtigen: Es war schwierig, eine immer gleichbleibende Zelldichte, eine gleiche Schlagfrequenz und eine gleiche Transfektionseffizienz der Kardiomyozyten zu erreichen. Folglich war die basale Inhibitor-1 Threonin³⁵, die Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung und die Antwort auf die Zugabe von 1 nM Isoprenalin zwischen den verschiedenen Präparationen unterschiedlich, was die quantitative Beurteilung des Einflusses von Calcineurin auf die Inhibitor-1 Threonin³⁵ und die Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung erschwerte. Allerdings führte die Inhibition von Calcineurin in jeder Präparation zu einer eindeutigen Erhöhung der Inhibitor-1-Threonin³⁵ und Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung im Vergleich zu DMSO behandelten Kontrollen. Ein weiteres Problem war die niedrige Konzentration von endogenem Inhibitor-1 in den Kardiomyozyten. Die Konzentration bewegt sich im nanomolarem Bereich und eine Detektion war nur über eine aufwendige Trichloressigsäure-Extraktion aus ausreichend viel Gewebe (>0,3 g) möglich. Da die Untersuchung an neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt werden sollte, wäre die hierfür benötigte Menge an Kardiomyozyten und somit auch an Tieren aus praktischen und ethischen Gründen nicht sinnvoll gewesen. Um dennoch eine ausreichende Sensitivität zu erreichen, wurde ein adenovirales Inhibitor-1

Überexpressionsmodell gewählt, mit dem die Kardiomyozyten infiziert wurden. Nur durch diesen adenoviralen Ansatz konnte eine adäquate Transfektionsrate erreicht werden, die mit den üblichen Transfektionsmethoden (Liposomen oder Kalzium-Phosphat vermittelt) nicht möglich wäre.

4.3.2 Der Einfluss der Calcineurinhemmung auf die Inhibitor-1-Threonin³⁵ und Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung

Die Untersuchungen an adenoviral überexprimierten Inhibitor-1 in neonatalen Kardiomyozyten zeigten, dass die Blockade von Calcineurin mit Cyclosporin A eine gesteigerte Inhibitor-1-Threonin³⁵ Phosphorylierung zur Folge hatte (s. Abb. 3.18). Die Ergebnisse unterstützen frühere *in vitro* Daten, die mit rekombinantem Protein durchgeführt wurden. Diese zeigten, dass Calcineurin Inhibitor-1 an Threonin³⁵ dephosphoryliert, während die Phosphatase-1 und 2c nicht aktiv waren (Hemmings 1984). Die Daten von Mulkey et al. (1994) belegten, dass die PKA Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ durch Calcineurin in Neuronen dephosphoryliert wird. Unsere Daten weisen darauf hin, dass der gleiche Mechanismus für die Dephosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ in Kardiomyozyten gilt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Calcineurin die basale Phosphorylierung von Inhibitor-1 und somit auch die basale Aktivität kontrolliert. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zu einer Studie an Nierenmarkschnitten, die eine sehr hohe Inhibitor-1 Konzentrationen aufwies (160 pmol/mg; Higuchi 2000). In dieser Studie hatte eine Calcineurinhemmung keinen Effekt auf die Inhibitor-1-Threonin³⁵ Phosphorylierung. Dieser Unterschied könnte entweder durch eine gewebsspezifische Regulierung z.B. durch eine zelltypspezifische Kompartimentierung der beteiligten Enzyme oder eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Cyclophilin sein. Cyclophilin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das mit einer hohen Affinität Cyclosporin A bindet und eine Katalysatorrolle bei der Hemmung von Calcineurin durch Cyclosporin A einnimmt (Handschumacher 1984; Harding 1986). Die maximale Inhibierung von Calcineurin durch Cyclosporin A ist abhängig von der intrazellulären Konzentration an Cyclophilin (K_d 5-200 nM abhängig von der Spezies; Liu 1990). Aus diesem Grund könnte die fehlende Hemmung auch auf die unzureichende Konzentration an Cyclophilin im Nierenmark zurückzuführen sein.

Die Blockade von Calcineurin mit Cyclosporin A führt aber nicht nur zu einer Erhöhung der Inhibitor-1-Threonin³⁵ Phosphorylierung, sondern auch zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von Phospholamban-Serin¹⁶ (s. Abb. 3.18). Die Phosphorylierungsstelle an Phospholamban-Serin¹⁶ wird durch die Phosphatase-1 und zu einem kleineren Teil

durch die Phosphatase-2A dephosphoryliert (MacDougall 2001). Calcineurin ist an der Dephosphorylierung von Phospholamban-Serin¹⁶ nicht beteiligt (MacDougall 2001). Aus diesem Grund ist der Anstieg der Phospholamban-Serin¹⁶ Phosphorylierung höchstwahrscheinlich auf die indirekte Hemmung der Dephosphorylierung von Inhibitor-1 zurückzuführen. Die Hemmung von Calcineurin geht mit einer gesteigerten Phosphorylierung von Inhibitor-1 einher und führt zur Inhibierung der Phosphatase-1. Durch die verminderte Phosphatase-1 Aktivität wird die Dephosphorylierung von Phospholamban-Serin¹⁶ gehemmt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Inhibitor-1 in insuffizienten Herzen herunterreguliert und die basale Phosphorylierung sehr niedrig ist. Die niedrige Phosphorylierung von Inhibitor-1-Threonin³⁵ und Phospholamban-Serin¹⁶ wurde bisher darauf zurückgeführt, dass die β -adrenerge Signalkaskade desensitiviert ist. Die vorliegenden Ergebnisse lassen aber auch den Schluss zu, dass es noch einen zusätzlichen Weg für die niedrige Phosphorylierung geben kann, indem die Ca^{2+} vermittelte Calcineurinaktivität in den insuffizienten Herzen erhöht ist, welche zu einer erhöhten Dephosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ führt. Gestützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse von Lim et al. (1999), die zeigten, dass die Calcineurinmenge und Aktivität in insuffizienten Herzen gesteigert ist. Diese Daten in neonatalen Kardiomyozyten zeigen, dass die Aktivität von Inhibitor-1 einerseits von der PKA und andererseits durch Calcineurin reguliert wird.

Neben der PKA wird der Inhibitor-1 aber auch durch die Ca^{2+} -abhängige PKC_α , welche ebenfalls eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielt, an der Phosphorylierungsstelle Serin⁶⁷ aktiviert (Braz 2004; Sahin 2006). Durch die Aktivierung des Inhibitor-1 an Serin⁶⁷ kommt es zu einer Abnahme der Inhibitor-1 Aktivität und steht somit im Gegensatz zur PKA Aktivierung an Threonin³⁵. Eine PKC_α -abhängige Phosphorylierung und Inaktivierung von Inhibitor-1 würde zur erhöhten Aktivität der Phosphatase-1, dadurch zu einer verminderten Phospholamban Phosphorylierung und somit zu einer verminderten Kontraktilität führen (Braz 2004). Die in der Herzinsuffizienz vermehrte gefundene Proteinmenge und Aktivität der PKC_α (Bowling 1999, Neumann 2002, Bayer 2003, Wang 2003) würde die Inaktivierung von Inhibitor-1 und somit die Hypokontraktilität beschleunigen.

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass der Inhibitor-1 im Herzen ein konditionelles, erst nach PKA-Phosphorylierung aktives Protein mit negativer Rückkopplung (Calcineurin-Dephosphorylierung) darstellt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen stellt der Inhibitor-1 möglicherweise ein Bindeglied zwischen den zwei wichtigsten sekundären Botenstoffen, cAMP und Ca^{2+} , dar (s. Abb. 4.2).

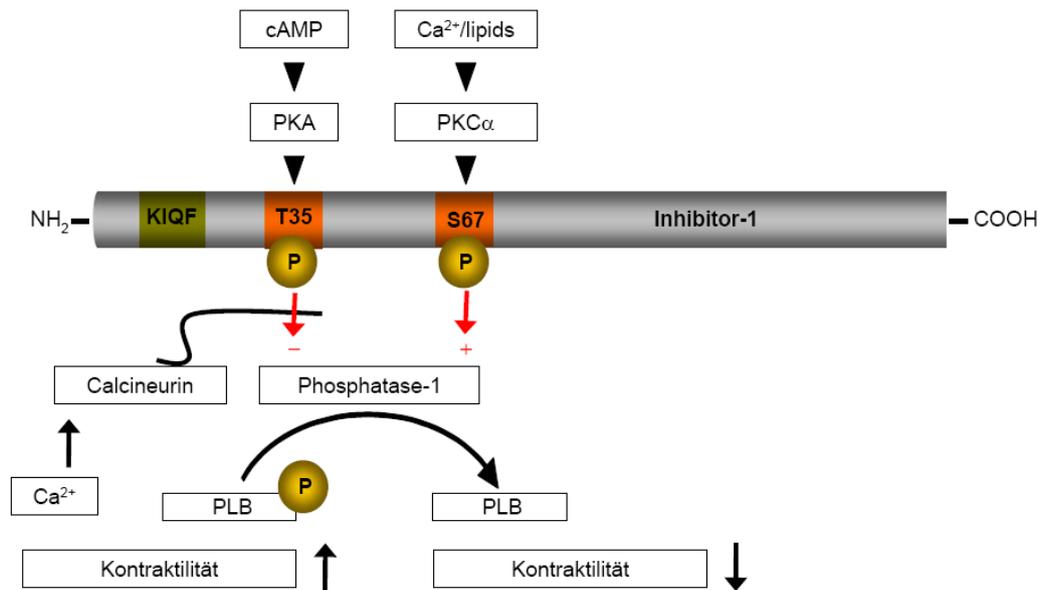


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Funktion und Regulation von Inhibitor-1 als *cross-talk* Element zwischen verschiedenen second messenger, Kinasen und Phosphatasen in Herzmuskelzellen. Inhibitor-1 erfährt positive und negative Regulation. β -adrenerge Stimulation führt über Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA zur Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Threonin³⁵ (T35) und somit über die Inhibition der Typ-1 Phosphatasen (PP1) zu einer gesteigerten Phospholamban (PLB) Phosphorylierung und Kontraktilität. Die Ca^{2+} -abhängige PKC_α phosphoryliert Inhibitor-1 an Serin⁶⁷ (S67). Dies hat funktionell den gegensinnigen Effekt einer PKA-vermittelten Phosphorylierung und bewirkt über eine Abnahme der Inhibitor-1 Aktivität eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung und Kontraktilität. Die PKA-Thr³⁵-Phosphorylierung wird durch die Ca^{2+} -aktivierte Typ 2B Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert. Der Inhibitor-1 ermöglicht so einen *cross-talk* zwischen den Signaltransduktionswegen der PKA und PKC_α .

Zusammenfassung

In der Herzinsuffizienz führt die chronische Erhöhung des Sympathikotonus zur Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges wodurch nachfolgend die Phosphorylierung von regulatorischen Phosphoproteinen verändert wird. Der Phosphorylierungszustand wichtiger Phosphoproteine kann über eine Aktivierung der entsprechenden Kinase oder eine Hemmung der entsprechenden Phosphatase verändert werden. Die Proteinphosphatasen werden unter anderem durch inhibitorische Proteine reguliert. Der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 stellt eines dieser inhibitorischen Proteine dar. Der Inhibitor-1 wird durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) an Threonin³⁵ phosphoryliert und hemmt ausschließlich in diesem Zustand die im Herzen vorherrschende Proteinphosphatase-1 (PP1).

Um Aufschluss über eine potentielle pathophysiologische Bedeutung von Inhibitor-1 bei der menschlichen Herzinsuffizienz zu erhalten, sollten die Proteinmenge sowie die PKA-Phosphorylierung (Aktivität) von Inhibitor-1 in insuffizienten menschlichen Herzen quantifiziert und diese mit nicht-insuffizienten Spenderherzen verglichen werden. Andererseits sollte untersucht werden, welche Proteinphosphatase für die Dephosphorylierung des Inhibitor-1 an Threonin³⁵ verantwortlich ist.

Während dieser Analysen zeigte sich, dass die immunologische Detektion von Inhibitor-1 mit den bisherigen verfügbaren Antikörpern weder histologisch noch in SDS-Standardhomogenaten möglich ist. Da Inhibitor-1 eine hohe Hitzestabilität und Säurelöslichkeit ausweist, gelang durch Trichloressigsäure (TCA)-Fällung und Kochen eine mehr als 500-fache Aufkonzentrierung. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen solcher TCA-Extrakte parallel zu rekombinanten Inhibitor-1 konnte die Inhibitor-1 Proteinkonzentration in menschlichen Herzproben bestimmt werden. Diese Untersuchung ergab, dass die Inhibitor-1 Konzentration im linksventrikulären Myokard mit ~120 nM deutlich über der IC_{50} (~1 nM) der PP1 lag und somit ausreichend war, um die kardiale PP1 effizient zu hemmen. Der Vergleich insuffizienter und nicht-insuffizienter Herzen ergab, dass die Inhibitor-1 Proteinmenge um 57% und der PKA-Phosphorylierungsgrad um 72% in insuffizientem Myokard erniedrigt sind. Außerdem konnte eine enge Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsgrad des Inhibitors-1 mit dem von Phospholamban, welches die Aufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum in der Diastole steuert, gezeigt werden. Dies deutete auf einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen den Funktionszuständen beider Proteine hin.

Mit Hilfe von spezifischen chemischen Phosphatase-Inhibitoren und phosphospezifischen Antikörpern konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass in Herzmuskelzellen der neugeborenen Ratte die Blockade der Ca^{2+} -abhängigen Typ 2B Phosphatase (Calcineurin) zu einer gesteigerten Inhibitor-1 Phosphorylierung an Threonin³⁵ führt. Dieser Befund korrelierte mit einer erhöhten Phosphorylierung des funktionell nachgeschalteten Phospholambans, das kein Substrat von Calcineurin ist.

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass Inhibitor-1 in der menschlichen Herzinsuffizienz reguliert ist und impliziert, dass die stark verminderte Proteinmenge und Phosphorylierung von Inhibitor-1 als Verstärkerelement β der α -adrenergen Signalkaskade zum Wirkungsverlust von Katecholaminen bei der Herzinsuffizienz beitragen könnten. Die hier dargestellten Befunde implizieren ferner, dass Calcineurin Inhibitor-1 *in vivo* dephosphoryliert und somit deaktivieren kann. Über Calcineurin könnte Inhibitor-1 einen potentiell wichtigen *cross talk* zwischen cAMP- und Ca^{2+} -Signalwege im Herzen vermitteln.

6 Abkürzungen

Für SI-Einheiten wurden die international gültigen Abkürzungen verwendet.

ANP	atriales natriuretisches Peptid
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CBFHH	calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Ctr	unbehandelte Kontrolle
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
EBSS	<i>Earle's based salt solution</i>
EC ₅₀	halbmaximale Effektorkonzentration
FKS	fetales Kälberserum
g (bei der Zentrifugation)	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G _{αq}	PLC-stimulierendes G-Protein
HEPES	(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
IP	Immunpräzipitation
ISO	Isoprenalin
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MG	Molekulargewicht
mN	milli-Newton

mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben
ns.	nicht signifikant
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PPI-1 (Inhibitor-1)	Proteinphosphataseinhibitor-1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA 2a	kardiale Isoform der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
TCA	Trichloressigsäure
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vs.	versus
Δ	Veränderung
\emptyset	Durchmesser

7 Literaturverzeichnis

1. Aitken, A., T. Bilham, et al. (1982). „Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle.“ *Eur J Biochem* 126(2): 235-46.
2. Aitken, A. and P. Cohen (1982). „Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle.“ *FEBS Lett* 147(1): 54-8.
3. Alder, R. and H. Barbas (1995). „Complementary distribution of the phosphoproteins DARPP-32 and I-1 in the cerebellar system.“ *Neuroreport* 6(17): 2368-72.
4. Allen PB, Hvalby O, Jensen V, et.al. (2000). „Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms.,” *J Neurosci.* 20(10):3537-43.
5. Anderson L, Seilhamer J. (1997) „A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver.,” *Electrophoresis.* 18(3-4):533-7
6. Bartel, S., P. Karczewski, et al. (1996). „G proteins, adenylyl cyclase and related phosphoproteins in the developing rat heart.“ *Mol Cell Biochem* 163-164: 31-8.
7. Bartel S., Stein B., Eschenhagen T., et al. (1996). „Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts.“ *Mol. Cell. Biochem.* 157:171–179.
8. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. (1999) „Adenovirus vectors for gene delivery.” *Curr Opin Biotechnol* 10: 440-447
9. Berrebi-Bertrand, I., M. Souchet, et al. (1998). „Biophysical interaction between phospholamban and protein phosphatase 1 regulatory subunit GM.“ *FEBS Lett* 439(3): 224 230.
10. Beullens, M., Van Eynde, et al., (1999) „ Molecular Determinants of Nuclear Protein Phosphatase-1 Regulation by NIPP-1“ *J. Biol. Chem.* 274, 14053–14061

11. Bers, D. M. (2002). „Cardiac excitation-contraction coupling.“ *Nature* 415(6868): 198-205.
12. Bers, D. M. and M. T. Ziolo (2001). „When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization.“ *Circ Res* 89(5): 373-5.
13. Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. (1987): „Improved silver staining of plantproteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.“ *Electrophoresis* 8: 93-99.
14. Bohm M, Beuckelmann D, et.al. (1988). „Reduction of β -adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium.“ *Eur Heart J.* 9:844–852.
15. Boknik P., Fockenbrock M., Herzig S., et al. „Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation“ *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2000) 362:222–231.
16. Boknik P., Khorchidi S., Bodor G.S., et al. „Role of protein phosphatases in regulation of cardiac inotropy and relaxation“. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2001) 280:786–794.
17. Böhm, M., P. Gierschik, et al. (1990). „Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy.“ *Circulation* 82(4): 1249-65.
18. Bradford, M. M. (1976). „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.“ *Anal Biochem* 72: 248-54.
19. Braz, J. C., K. Gregory, et al. (2004). „PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure.“ *Nat Med* 10(3): 248-54.
20. Bristow, M. R., R. Ginsburg, et al. (1982). „Decreased catecholamine sensitivity and betaadrenergic-receptor density in failing human hearts.“ *N Engl J Med* 307(4): 205-11.
21. Bristow, M. R., R. Ginsburg, et al. (1986). „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 downregulation in heart failure." *Circ Res* 59(3): 297-309.
22. Bristow, M. R., W. A. Minobe, et al. (1993). „Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart.“ *J Clin Invest* 92(6): 2737-45.
23. Brodde OE, Michel MC. (1999). „Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart.“, *Pharmacol Rev.* 51(4): 651-90.
24. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. (2006). „Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance.“, *J Pharmacol Sci.* 100(5): 323-37
25. Bundesamt, S. (2006). Statistisches Bundesamt.
26. Campbell, K. P., D. H. MacLennan, et al. (1983). „Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein.“ *J Biol Chem* 258(2): 1197-204.
27. Carr, A. N., A. G. Schmidt, et al. (2002). „Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function.“ *Mol Cell Biol* 22(12): 4124-35.
28. Carr, A. N., R. L. Sutliff, et al. (2001). „Is myosin phosphatase regulated in vivo by inhibitor-1? Evidence from inhibitor-1 knockout mice.“ *J Physiol* 534(Pt. 2): 357-66.
29. Cazorla O, Szilagy S, et al. (2006) „Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice.“, *Cardiovasc Res.* 69(2):370-80
30. Ceulemans H, Bollen M. (2004). „Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button.“, *Physiol Rev.* 84(1):1-39. Review
31. Cohen, P. (1989). „The structure and regulation of protein phosphatases.“ *Annu Rev Biochem* 58: 453-508.
32. Cohen, P., D. B. Rylatt, et al. (1977). „The hormonal control of glycogen metabolism: the amino acid sequence at the phosphorylation site of protein phosphatase inhibitor-1.“ *FEBS Lett* 76(2): 182-6.

33. Cohen, P. T. (1988). „Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene.“ FEBS Lett 232(1): 17-23.
34. Cohen, P. T. W. (1990). „Molecular biology of protein serine/threonine phosphatases regulating metabolism. Genetics and Human Nutrition.“ P. J. Randle, J. I. Bell and J. Scott. New York, John Libbey: 27-40.
35. Cohen, P. T. (1997). „Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life.“ Trends Biochem Sci 22(7): 245-51
36. Cohen, P. T. (2002). „Protein phosphatase 1--targeted in many directions.“ J Cell Sci 115(Pt 2): 241-56.
37. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.“ Anal Biochem 162(1): 156-9.
38. Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). „FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).“ Gene 173(1 Spec No): 33-8.
39. Cuello F, Bardswell SC, et.al. (2007). „Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca²⁺ sensitivity in ventricular myocytes.“ Circ Res. 100(6):864-73.
40. Dorn, G. W., 2nd and J. D. Molkentin (2004). „Manipulating cardiac contractility in heart failure: data from mice and men.“ Circulation 109(2): 150-8.
41. Donahue JK, Heldman AW, et.al. (2000). „Focal modification of electrical conduction in the heart by viral gene transfer.“ Nat Med. 6:1395–1398.
42. del Monte F, Harding SE, et.al. (1999). „Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a.“ Circulation. 100:2308–2311.

43. Egloff, M. P., D. F. Johnson, et al. (1997). „Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1.“ *Embo J* 16(8): 1876-87.
44. El-Armouche, A., T. Rau, et al. (2003). „Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes.“ *Faseb J* 17(3): 437-9.
45. El-Armouche A, Pohlmann L, et.al. (2007). „Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure.,“ *J Mol Cell Cardiol.* 43(2):223-9.
46. El-Armouche A, Gocht F, et.al. (2007). „Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart.,“ *Eur J Heart Fail.* 9(11):1077-80.
47. El-Armouche A, Wittköpper K, et.al. (2008). „Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy.,“ *Cardiovasc Res.* 80(3):396-406.
48. El-Armouche A, Eschenhagen T. (2008). „beta-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart.“ *Heart Fail Rev.* 2008 Dec 27.
49. Elbrecht, A., J. DiRenzo, et al. (1990). „Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues.“, *J Biol Chem* 265(23): 13415-8.
50. Endo, S., J. H. Connor, et al. (1997). „Conversion of protein phosphatase 1 catalytic subunit to a Mn(2+)-dependent enzyme impairs its regulation by inhibitor 1.“ *Biochemistry* 36(23): 6986-92.
51. Endo, S., X. Zhou, et al. (1996). „Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor.“ *Biochemistry* 35(16): 5220-8.

-
52. Engelhardt S, Hein L, et al. (2004). „Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation.“ *Circulation*. 109(9):1154-60.
53. Eschenhagen T. (1993). „G proteins and the heart.“ *Cell Biol Int*. 17:723–749.
54. Eschenhagen T. (2008). „Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die.“ *Nat Med*. 14(5):485-7.
55. Eschenhagen, T. W., J. (1998). *Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz. Handbuch der molekularen Medizin, Band 3. S.-V. B. Heidelberg. Berlin Heidelberg, Ganten, D.; Ruckpaul, K. 3: 147-221.*
56. Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). „A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.“ *Anal Biochem*. 132(1):6-13.
57. Feldman, A. M., A. E. Cates, et al. (1988). „Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart.“ *J Clin Invest* 82(1): 189-97.
58. Fill, M. and J. A. Copello (2002). „Ryanodine receptor calcium release channels.“ *Physiol Rev* 82(4): 893-922.
59. Foulkes, J. G. and P. Cohen (1979). „The hormonal control of glycogen metabolism. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to adrenaline.“ *Eur J Biochem* 97(1): 251-6.
60. Foulkes, J. G., L. S. Jefferson, et al. (1980). „The hormonal control of glycogen metabolism: dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 in vivo in response to insulin.“ *FEBS Lett* 112(1): 21-4.
61. Frank, K. F., B. Bolck, et al. (2002). „Modulation of SERCA: implications for the failing human heart.“ *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: 172-8.
62. Frey N, McKinsey TA, Olson EN. (2000). „Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function.“ *Nat Med*. 6:1221–1227.

-
63. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. 2000 „Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system., Trends Pharmacol Sci.21(11): 426-31.
64. Genoux D, Haditsch U, et.al. (2002) „Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory., Nature. 418(6901):970-5
65. Gupta, R. C., S. Mishra, et al. (2003). „Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts.“ Am J Physiol Heart Circ Physiol 285(6): H2373-81.
66. Gupta, R. C., J. Neumann, et al. (1996). „Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte.“ Am J Physiol 270(4 Pt 2): H1159-64.
67. Gustafson EL, Girault JA, et.al. (1991) „Immunocytochemical localization of phosphatase inhibitor-1 in rat brain.“ J Comp Neurol. 310(2):170-88.
68. Haghghi K, Kolokathis F, et.al. (2003). „Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human.“ J Clin Invest. 111:869–876.
69. Haq, S., G. Choukroun, et al. (2001). „Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure.“ Circulation 103(5): 670-7.
70. Handschumacher RE, Harding MW, et.al. (1984) „Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A.“ Science. 226(4674):544-7.
71. Harding MW, Handschumacher RE, Speicher DW. (1986). „Isolation and amino acid sequence of cyclophilin“. J Biol Chem. Jun 25;261(18):8547-55.
72. Hajjar, R. J., F. U. Muller, et al. (1998). „Molecular aspects of adrenergic signal transduction in cardiac failure.“ J Mol Med 76(11): 747-55.
73. Hasenfuss, G. and B. Pieske (2002). „Calcium cycling in congestive heart failure.“ J Mol Cell Cardiol 34(8): 951-69.

-
74. Hasenfuss, G., H. Reinecke, et al. (1996). „Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure.“ *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2: 17-22.
75. Hasking, G. J., M. D. Esler, et al. (1986). „Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity.“ *Circulation* 73(4): 615-21.
76. Hitt, M., A. J. Bett, et al., (1987). „Techniques for Human adenovirus vector construction and characterization.“ *Methods in molecular genetic*. Academic press: 13-30.
77. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. (1997). „Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells.“ *Adv Pharmacol*. 40:137-206. Review.
78. He, T. C., S. Zhou, et al. (1998). „A simplified system for generating recombinant adenoviruses.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2509-14.
79. Heim, R., A. B. Cubitt, et al. (1995). „Improved green fluorescence.“ *Nature* 373(6516): 663-4.
80. Herzig, S. and J. Neumann (2000). „Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes.“ *Physiol Rev* 80(1): 173-210.
81. Hemmings Jr.H.C., A.C. Nairn, P. Greengard et. Al. (1984) „DARPP-32, a dopamine- and adenosine 30:50-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein.“ II. „Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1“ *J. Biol. Chem.* 259 14491–14497.
82. Heubach JF, Rau T, et al. (2002). „Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart.“ *Br J Pharmacol*. 136(2):217-29.
83. Higuchi E., A. Nishi, et al. (2000). „Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla“ *Eur. J. Pharmacol.* 408 107–116.

-
84. Hoshijima M, Ikeda Y, et al. (2002). „Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery.“ *Nat Med.* 8:864–871.
85. Huang, F. L. and W. H. Glinsmann (1976). „Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle.“ *Eur J Biochem* 70(2): 419-26.
86. Huang, H. B., A. Horiuchi, et al. (1999). „Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2.“ *J Biol Chem* 274(12): 7870-8.
87. Huang, K. X. and H. K. Paudel (2000). „Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5824-9.
88. Hubbard, M. J. and P. Cohen (1993). „On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation.“ *Trends Biochem Sci* 18(5): 172-7.
89. Ikemoto, N., M. Ronjat, et al. (1989). „Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum.“ *Biochemistry* 28(16): 6764-71.
90. Iyer, R. B., S. B. Koritz, et al. (1988). „A regulation of the level of phosphorylated phospholamban by inhibitor-1 in rat heart preparations in vitro.“ *Mol Cell Endocrinol* 55(1): 1-6.
91. Jalili, T., Y. Takeishi, et al. (1999). „Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC.“ *Cardiovasc Res* 44(1): 5-9.
92. Janssen PM, Schillinger W, et al. (2002). „Intracellular-blockade: overexpression of Gai2 depresses the β -adrenergic response in intact myocardium.“ *Cardiovasc Res.* 2002;55:300-308.
93. Jiang MT, Lokuta AJ, et al. (2002). „Abnormal Ca²⁺ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure.“ *Circ Res.* 91:1015–1022.

-
94. Jweied E, deTombe P, Buttrick PM. (2007). „The use of human cardiac tissue in biophysical research: the risks of translation., J Mol Cell Cardiol. 42(4):722-6. Review.
95. Karczewski P., Bartel S., Krause E.G. (1990)“ Differential sensitivity to isoprenaline of troponin I and phospholamban phosphorylation in isolated rat hearts“. Biochem. J. 266:115–122.
96. Khatra, B. S., Chiasson J. L., et al. (1980). „Effect of epinephrine and insulin on the phosphorylation of phosphorylase phosphatase inhibitor 1 in perfused rat skeletal muscle.“ FEBS Lett 114(2): 253-6.
97. Keys, J. R. and W. J. Koch (2004). „The adrenergic pathway and heart failure.“ Recent Prog Horm Res 59: 13-30.
98. Kim, Y. M., T. Watanabe, et al. (2003). „PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation.“ J Biol Chem 278(16): 13819-28.
99. Klee, C.B., H.Ren, et.al (1998). „Regulation of the calmodulinstimulated protein phosphatase, calcineurin.“, J. Biol. Chem. 273 13367–13370.
100. Koss K.L., Kranias E.G. (1996) „Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility“ Circ. Res. 79:1059–1063.
101. Kunz J, Hall MN. (1993) „Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression“, Trends Biochem Sci.;18(9):334-8. Review.
102. Laemmli UK, (1970) „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ Nature 227:680-685
103. Lim, H.W., J.D. Molkenin, (1999)“Calcineurin and human heart failure“, Nat. Med. 5 246–247.
104. Liu J, M.W. Albers, et al., (1990) „Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in Escherichia coli and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 2304–2308.

-
105. Lohse, M. J., S. Engelhardt, et al. (2003). „What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?“ *Circ Res* 93(10): 896-906.
106. Lowenstein, P. R., A. F. Shering, et al. (1995). „Immunolocalisation of protein phosphatase inhibitor-1 in the cerebral cortex of the rat, cat and ferret.“ *Brain Res* 676(1): 80-92.
107. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). „Protein measurement with the Folin phenol reagent.“ *J Biol Chem* 193(1): 265-75.
108. Luo, C., K. T. Shaw, et al. (1996). „Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17): 8907-12.
109. MacDougall, L. K., D. G. Campbell, et al. (1989). „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* 1010(2): 218-26.
110. MacDougall, L. K., Jones L. R., et al. (1991). „Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban.“ *Eur J Biochem* 196(3): 725-34.
111. MacLennan, D. H. and E. G. Kranias (2003). „Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility.“ *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 566-77.
112. Maier, L. S. and D. M. Bers (2002). „Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond.“ *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 919-39.
113. Marx, S. O., S. Reiken, et al. (2000). „PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts.“ *Cell* 101(4): 365-76.
114. Marx S.O., Reiken S., Hisamatsu Y., et al. (2001) „ Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers“. *J. Cell. Biol.* 153:699–708.

-
115. Messer AE, Jacques AM, Marston SB. (2007). „Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure.“, *J Mol Cell Cardiol.* 42(1):247-59.
116. Mishra, S., R. C. Gupta, et al. (2002). „Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium.“ *J Heart Lung Transplant* 21(3): 366-73.
117. Molkenin JD, Lu JR, et.al. (1998). „A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy.“, *Cell.* 93(2):215-28.
118. Molkenin, J. D. (2000). „The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.“ *J Biol Chem* 275(50): 38949-52.
119. Morise, H., O. Shimomura, et al. (1974). „Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*.“ *Biochemistry* 13(12): 2656-62.
120. Molkenin, J.D. and Dorn, I.G., (2001)“Cytoplasmatic signalling pathways that regulate cardiac hypertrophy.“ *Annu Rev. Physiol.* 63:391-426.
121. Mulkey, R. M., S. Endo, et al. (1994). „Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression.“ *Nature* 369(6480): 486-8.
122. Münch, G., B. Bolck, et al. (2000). „SERCA2a activity correlates with the force-frequency relationship in human myocardium.“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(6): H1924-32.
123. Münch G, Bölck B, et.al. (2002). „Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium.“, *J Mol Cell Cardiol.* 34(3):321-34.
124. Murphy, N. F., C. R. Simpson, et al. (2004). „National survey of the prevalence, incidence, primary care burden, and treatment of heart failure in Scotland.“ *Heart* 90(10): 1129-36.

-
125. Neumann J, Schmitz W, et.al. (1988). „Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure.“ *Lancet*. 2:936–937.
126. Neumann J., Herzig S., Boknik P., et al. (1995) „On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor.“ *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274:530–539.
127. Neumann, J., P. Boknik, et al. (1993). „Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid.“ *Am J Physiol* 265(1 Pt2): H257-66.
128. Neumann, J., T. Eschenhagen, et al. (1997). „Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure.“ *J Mol Cell Cardiol* 29(1):265-72.
129. Neumann J. (2002) „Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca²⁺ movement.,“ *Basic Res Cardiol.*;97 Suppl 1:I91-5. Review.
130. Neumann, J., R. C. Gupta, et al. (1991). „Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart.“ *Circ Res* 69(6):1450-7.
131. Neumann, J., R. Maas, et al. (1999). „Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts.“ *J Pharmacol Exp Ther* 289(1): 188-93.
132. Nimmo, G. A. and P. Cohen (1978). „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* 87(2): 353-65.
133. Nimmo, G. A. and P. Cohen (1978). „The regulation of glycogen metabolism. Purification and characterisation of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle.“ *Eur J Biochem* 87(2): 341-51.
134. Nguyen C, Hosokawa T, et.al. (2007). „Differential regulation of the Cdk5-dependent phosphorylation sites of inhibitor-1 and DARPP-32 by depolarization.,“ *J Neurochem.* 103(4):1582-93.

-
135. Pathak A, del Monte F, et.al. (2005) „Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1.,“ *Circ Res.* 15;96(7):756-66.
136. Pieske, B., B. Kretschmann, et al. (1995). „Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy.“ *Circulation* 92(5): 1169-78.
137. Pilbrow A.P., Ellmers L.J. et al (2008). „Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium.“ *BMC Medical Genomics* 1:64
138. Post, S. R., H. K. Hammond, et al. (1999). „Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure.“ *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 343-60.
139. Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, et al. (1992). „Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.“ *Gene* 111(2): 229-33.
140. Rapundalo, S. T. (1998). „Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates.“ *Cardiovasc Res* 38(3): 559-88.
141. Rao, A., C. Luo, et al. (1997). „Transcription factors of the NFAT family: regulation and function.“ *Annu Rev Immunol* 15: 707-47.
142. Rau T, Nose M, et.al. (2003). „Overexpression of wild-type Gai2 suppresses β -adrenergic signaling in cardiac myocytes.“ *FASEB J.* 17:523–525.
143. Remme, C. A., C. A. Schumacher, et al. (2001). „K(ATP) channel opening during ischemia: effects on myocardial noradrenaline release and ventricular arrhythmias.“ *J Cardiovasc Pharmacol* 38(3): 406-16.
144. Rodriguez, P., B. Mitton, et al. (2007). „Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes.“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H762-9.
145. Rockman, H. A., W. J. Koch, et al. (2002). „Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function.“ *Nature* 415(6868): 206-12.

-
146. Sambrook, J., Fritsch EF, Maniatis T (1989) „Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd Edition.“ Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
147. Sambrook, J., D. W. Rusell, et al. (2001). Extraction, Purification and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1: 7.17.
148. Sahin, B., H. Shu, et al. (2006). „Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C.“ J Biol Chem 281(34): 24322-35.
149. Saucerman, J. J., L. L. Brunton, et al. (2003). „Modeling beta-adrenergic control of cardiac myocyte contractility in silico.“ J Biol Chem 278(48): 47997-8003.
150. Sasaki, K., H. Shima, et al. (1990). „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 81(12): 1272-80.
151. Schnabel, P. and M. Bohm (1999). „[Sympathetic activation in heart failure: A target of therapeutic approaches].“ Z Kardiol 88 Suppl 3: S5-S11.
152. Schmidt, U., R. J. Hajjar, et al. (1999). „Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban.“ Am J Physiol 277(2 Pt 2): H474-80.
153. Schwinger, R. H., G. Munch, et al. (1999). „Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation.“ J Mol Cell Cardiol 31(3): 479-91.
154. Scrimgeour AG, Allen PB, et.al. (1999). „Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle.,“ J Biol Chem. 274(30):20949-52.
155. Shenolikar, S. (1995). „Protein phosphatase regulation by endogenous inhibitors.“ Semin Cancer Biol 6(4): 219-27.

-
156. Shenolikar, S. and A. C. Nairn (1991). „Protein phosphatases: recent progress.“ *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23: 1-121.
157. Shibasaki F, Price ER, et.al. (1996). „Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NFAT4.,“ *Nature*. 382(6589):370-3.
158. Shima H, Hatano Y, et.al. (1993). „Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues.“ *Biochem Biophys Res Commun*. 192(3):1289-96.
159. Shimomura, O. (1979). „Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein.“ *FEBS Letters* 104(2): 220-22.
160. Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). „Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.“ *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39.
161. Snyder, G. L., J. A. Girault, et al. (1992). „Phosphorylation of DARPP-32 and protein phosphatase inhibitor-1 in rat choroid plexus: regulation by factors other than dopamine.“ *J Neurosci* 12(8): 3071-83.
162. Steenaart, N. A., J. R. Ganim, et al. (1992). „The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme.“ *Arch Biochem Biophys* 293(1): 17-24.
163. Steinberg, S. F. (1999). „The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes.“ *Circ Res* 85(11): 1101-11.
164. Stewart, S., K. MacIntyre, et al. (2003). „Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?“ *Heart* 89(1): 49-53.
165. Swedberg, K. (2006). „Diagnostic and therapeutic algorithms in chronic heart failure.“ *Herz* 31(9): 877-90.

-
166. Tokui, T., F. Brozovich, et al. (1996). „Enhancement of smooth muscle contraction with protein phosphatase inhibitor 1: activation of inhibitor 1 by cGMP-dependent protein kinase.“ *Biochem Biophys Res Commun* 220(3): 777-83.
167. Ungerer, M., M. Bohm, et al. (1993). „Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart.“ *Circulation* 87(2): 454-63.
168. Ungerer, M., G. Parruti, et al. (1994). „Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart.“ *Circ Res* 74(2): 206-13.
169. van der Heyden, M. A., T. J. Wijnhoven, et al. (2005). „Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels.“ *Cardiovasc Res* 65(1): 28-39.
170. Watanabe, T., H. B. Huang, et al. (2001). „Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3080-5.
171. Wegener, A. D., H. K. Simmerman, et al. (1989). „Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation.“ *J Biol Chem* 264(19): 11468-74.
172. Xiang, Y. and B. K. Kobilka (2003). „Myocyte adrenoceptor signaling pathways.“ *Science* 300(5625): 1530-2.
173. Yano, M., Y. Ikeda, et al. (2005). „Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure.“ *J Clin Invest* 115(3): 556-64.
174. Zakhary, D. R., C. S. Moravec, et al. (1999). „Protein kinase A (PKA)-dependent troponin-I phosphorylation and PKA regulatory subunits are decreased in human dilated cardiomyopathy.“ *Circulation* 99(4): 505-10.
175. Zhang R, Zhao J, et al. (1995). „Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation.“ *Circ Res.* 76(6):1028-35.

8 Verzeichnis der Veröffentlichungen

1. Ditz D., Pamminer T., El-Armouche A., Eschenhagen T. Effect of Green Fluorescent Protein encoding adenoviral vectors on contractility in cardiacmyocytes. 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. Pamminer T, El-Armouche A, Eschenhagen T. Evidence for decreased expression and activity of phosphatase inhibitor-1 in human heart failure Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003;367:R91.
3. El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminer 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.
4. El-Armouche A, Pamminer 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.
5. El-Armouche A, Bednorz A, Pamminer 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 ResCommun 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.

Zellpräparation und Kultur

[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Applichem, Darmstadt
10 x Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM) Pulver	Invitrogen, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNase II, Typ V	Sigma, Deisenhofen
Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
flüssiges Silikon	Dow Corning, Wiesbaden
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MgSO_4	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
P/S	Biochrom, Berlin
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin, certified crude 1:250	Difco, Detroit, USA

Proteinmethoden

Acrylamid 4K Lösung 30 %	Applichem, Darmstadt
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
beta-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt

Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Applichem, Darmstadt
NaF	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen

RNA-Methoden

10x Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Weiterstadt
AmpliAq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mmol/l)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Ethidiumbromid 1%ig in H ₂ O	Merck, Darmstadt
GenScreen	NEN-DuPont, Bad Homburg
Rinderserumalbumin	Sigma, Steinheim
TriStar Reagent TM	AGS, Heidelberg
TRIzol Reagent TM	GibcoBRL/Life Technol., Karlsruhe
tRNA aus Bäckerhefe	Roche, Mannheim

Immunhistochemie

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Triton-X 100	Fluka, Steinheim
Propidiumiodid	Molecular Probes, Eugene, USA

Allgemein verwendete Chemikalien

Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
HCl 32 %	Roth, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	Merck, Darmstadt

NaOH	Applichem, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
9.2 Geräte und Hilfsmittel	
Abstandhalter	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammern/blotkammern (Mini Trans-Blot Cell)	Bio-Rad, München
Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300)	Bio-Rad, München
Glasschalen	Roth, Karlsruhe
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
MicroAmp optical tubes und caps	Applied Biosystems, Weiterstadt
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Photometer (Smart Spec 3000)	Bio-Rad, München
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfen (Easypet)	Eppendorf, Hamburg
Quarzglasküvetten	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rollmischer (Assistent RM 5)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön
Thermoblöcke (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg
USF Reinstwassersystem	USF Deutschland, Ransbach- Baumbach
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbäder (C20 CS)	Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturschalen	Corning, Acton, USA
Zellkulturschränke (IG 150)	Jouan, Unterhaching
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

10 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Überlassung der sehr interessanten und methodisch vielseitigen Aufgabenstellung, wie auch die sehr gute Betreuung, insbesondere der zahlreichen Ratschläge und anregenden Diskussionen, die auch über die Aufgabenstellung hinausgingen, bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD. Dr. Ali El-Armouche für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung der Arbeit und der damit verbundenen Mühen bedanken. Vor allem schätzte ich seinen stetigen Beistand im Kampf mit den Unwägbarkeiten des Proteinphosphataseinhibitors und der unermüdlichen Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Dr. Thoms Rau möchte ich für die vielen theoretischen Hintergrundinformationen und vor allem der Einführung in die konfokale Mikroskopie danken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Wolfram Zimmermann und Dr. Oliver Zolk für die vielen praktischen Hinweise.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Diana Dietz für die schöne Zeit, die interessanten Diskussionen und die Hilfe bei der Bewältigung unserer Themen bedanken.

Dr. Felix Münzel, Herrn Ingo Schubert und Frau Dr. Ulrike Mühlhäuser danke ich für die interessanten Diskussionen, der vielen Hinweise und die große emotionale Unterstützung.

Ich danke der DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduierten Kollegs.

Bei allen nicht persönlich genannten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Erlangen und Hamburg möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die sehr familiäre Atmosphäre bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Bruder Henry, meinem Neffen Lucas, Frau Sabine Pfortner, meiner Tante Marianne Leiser und meiner Cousine Sabine Wischalla für ihre Unterstützung.

Zum Schluß gehört ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, ohne sie wären dieses Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie haben mich in den sehr schwierigen Zeiten immer unterstützt und ohne ihre Hilfe hätte ich diese Zeit wohl nicht überstanden.

11 Lebenslauf

12 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese 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.