

Mechanismen der Phospholamban-vermittelten Regulation von SERCA2a

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Florian Konrad Alexander Funk
aus Wuppertal

Düsseldorf, Juli 2018

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. med. Joachim P. Schmitt

2. Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf und Kardiomyozytenkontraktion	1
1.1.1 Exzitations-/Kontraktionskopplung in Kardiomyozyten.....	1
1.1.2 Regulation der Kontraktion und des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs durch β-adrenerge Signale.....	4
1.2 Molekulare Vorgänge in Kardiomyozyten während der kardialen Relaxationsphase	5
1.2.1 SERCA2a.....	6
1.2.2 Regulation der SERCA2a-Aktivität durch Phospholamban.....	7
1.2.3 Regulation der inhibitorischen Aktivität von Phospholamban durch Kinasen	8
1.2.4 Regulation des Phosphorylierungszustands von Phospholamban durch Phosphatasen	9
1.2.5 Die Oligomerisierung von Phospholamban und dessen Bedeutung für die Inhibition von SERCA2a.....	10
1.2.6 Die Phospholamban-Mutation „R9C“	12
1.2.7 Weitere Regulatoren der SERCA2a-Aktivität.....	12
1.3 Myokardinfarkt.....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
1.4.1 Welche Bedeutung haben PLN-Pentameren für die Regulation von SERCA2a?	15
1.4.2 Ist die Pentamerbildung von PLN an der Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie beteiligt?	15
1.4.3 Kommt es im <i>remote</i> Myokard zu Veränderungen an kalziumregulierenden Proteinen?.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Erzeugung und Haltung transgener Mauslinien	17
2.2 Organentnahme	17
2.3 Proteinextraktion aus Herzgewebe.....	18
2.4 Präparation von Membranfraktionen aus Herzgewebe	18
2.5 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	19
2.6 Kultivierung von HEK293-Zellen.....	19
2.7 Transfektion von HEK293-Zellen mittels Kalziumphosphat-Methode.....	19
2.8 Proteinextraktion aus HEK293-Zellen.....	20
2.9 Detektion von Proteinen mittels Immunoblot (<i>western blot</i>).....	20
2.10 Immunopräzipitation von PLN aus transfizierten HEK293-Zellen.....	20

2.11	Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN mittels Phos-Tag™	21
2.12	Herstellung kompetenter Bakterien	21
2.13	Transformation kompetenter Bakterien.....	22
2.14	DNA-Aufreinigung aus transformierten Bakterien.....	22
2.15	Plasmide und DNA-Konstrukte.....	22
2.16	Messung der PP1- und PP2A-Aktivität	24
2.17	Isolation von Kardiomyozyten aus Mausherzen und Messung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs	24
2.18	Induktion von Ischämie/Reperfusion.....	25
2.19	Statistische Auswertung	26
2.20	Verwendete Antikörper.....	26
2.21	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Die Rolle von PLN-Pentameren in der Regulation von SERCA2a	29
3.1.1	Molekulare Charakterisierung der Mauslinien TgPLN und TgAFA als Modell für rein monomeres Phospholamban.....	29
3.1.2	Der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf in isolierten Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren.....	31
3.1.3	Basaler Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren und -Pentameren an den Phosphorylierungsstellen S16 und T17	32
3.1.4	Das Verhältnis von PLN-Pentameren zu Monomeren in ventrikulären Herzgewebe-Lysaten der Maus in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand	33
3.1.5	Basaler Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 in TgPLN und TgAFA	35
3.1.6	Basaler Phosphorylierungszustand der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle T17 in TgPLN und TgAFA.....	36
3.1.7	Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 in TgPLN und TgAFA nach Stimulation der PKA-Aktivität	37
3.1.8	Untersuchung des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren mittels Phos-Tag™ SDS-PAGE.....	37
3.1.9	Phosphorylierungszustand von PLN-Pentameren nach β -adrenerger Stimulation	39
3.1.10	Phosphorylierungszustand weiterer Zielproteine der PKA in den Mauslinien TgPLN und TgAFA.....	40
3.1.11	Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN und HAX-1 in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren.....	41
3.2	Die Bedeutung von PLN-Pentameren für die Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie	42

3.2.1	Mauslinien zur Charakterisierung des dominanten Phosphorylierungsdefekts von PLN-R9C	42
3.2.2	Untersuchung der Oligomerisierung von F-R9C	43
3.2.3	Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen F-R9C und SERCA2a..	45
3.2.4	Untersuchung des Phosphorylierungszustands von F-PLN und F-R9C mittels Phos-Tag™	46
3.2.5	Phosphorylierungszustand von endogenem Wildtyp-PLN in Anwesenheit von F-R9C oder F-AFA-R9C	48
3.3	Die Rolle von Phospholamban in der Entstehung kardialer Dysfunktion im <i>remote</i> Myokard in der Frühphase nach Myokardinfarkt.....	51
3.3.1	Untersuchung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs in isolierten Kardiomyozyten des <i>remote</i> Myokards 24 Stunden nach einstündiger Ischämie	51
3.3.2	Untersuchung der Expression von Proteinen des SERCA2a-Komplexes im RM nach I/R.....	52
3.3.3	PLN-Phosphorylierungszustand an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 im RM nach I/R.....	55
3.3.4	Untersuchung der PKA-Aktivität und -Expression im RM nach I/R	57
3.3.5	Untersuchung weiterer Proteine mit PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen im RM nach I/R	58
3.3.6	Untersuchung der Proteinexpression von Proteinphosphatase 1 (PP1) und Inhibitor-1 (I-1) im RM nach I/R	59
3.3.7	Untersuchung der Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A im RM nach I/R.....	60
4	Diskussion	62
4.1	Die Rolle von PLN-Pentameren in der Regulation der SERCA2a-Aktivität	62
4.2	Die Bedeutung von PLN-Pentameren für die Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie	69
4.3	Die Rolle von Phospholamban in der Entstehung kardialer Dysfunktion im <i>remote</i> Myokard in der Frühphase nach Myokardinfarkt.....	72
5	Zusammenfassung	78
6	Summary	79
7	Literaturverzeichnis.....	80
	Veröffentlichungen	91
	Originalarbeiten	91
	Kongressbeiträge	91
	Lebenslauf.....	92
	Danksagung	93
	Eidesstattliche Versicherung	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs.	2
Abbildung 2: Schemazeichnung der Vorgänge im Sarkomer während der Kontraktion.....	3
Abbildung 3: Schemazeichnung des katalytischen Zyklus der Familie der P-Typ ATPasen...	7
Abbildung 4: Regulation der PLN-vermittelten SERCA2a-Inhibition durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung	9
Abbildung 5: Die Cysteinreste 36, 41 und 46 sind kritisch für die Oligomerisierung von PLN	11
Abbildung 6: Vektorkarte von pcDNA3	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung des genetischen Hintergrunds der verwendeten Mauslinien PLN-KO, TgAFA und TgPLN.....	29
Abbildung 8: Vergleich der Transgenexpression in Herzventrikeln der Mauslinien TgPLN und TgAFA	30
Abbildung 9: Untersuchung des Einflusses von PLN-Pentameren auf die zytosolische Kalziumelimination.	32
Abbildung 10: Untersuchung des basalen Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren und -Pentameren.....	33
Abbildung 11: Untersuchung der Abhängigkeit des Verhältnisses von Pentameren zu Monomeren vom Phosphorylierungszustand	34
Abbildung 12: Die PKA-abhängige S16-Phosphorylierung von PLN-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren	35
Abbildung 13: Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLN-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren	36
Abbildung 14: PKA-abhängige Phosphorylierung von PLN-Monomeren bei verstärkter PKA-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren.	37
Abbildung 15: Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren (PLN _M) in der An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren mittels phosphate mobility shift assay (Phos-Tag™).....	38
Abbildung 16: Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN-Pentameren in der Mauslinie TgF-PLN mittels phosphate mobility shift assay (Phos-Tag™).....	39
Abbildung 17: Die Expression und PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin-I in den Mauslinien TgPLN und TgAFA	40
Abbildung 18: Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Ryanodinrezeptor-2 in den Mauslinien TgPLN und TgAFA	41
Abbildung 19: Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN und HAX-1 in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren	42

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Transgenkonstrukte der Mauslinien TgR9C, TgF-R9C, TgF-PLN und TgF-AFA-R9C.....	43
Abbildung 21: Untersuchung der Oligomerisierung von F-R9C.....	44
Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses der R9C-Mutation auf die Protein-Protein-Interaktion von PLN und SERCA2a.....	45
Abbildung 23: Der verwendete FLAG-Antikörper ist spezifisch für das FLAG-Epitop.....	46
Abbildung 24: Vergleich des basalen Phosphorylierungszustands von F-PLN und F-R9C in den Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C.....	47
Abbildung 25: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Mauslinien TgR9C und TgAFA-R9C....	48
Abbildung 26: Analyse des Phosphorylierungszustands endogener, wildtypischer PLN-Monomere in den Mauslinien TgF-R9C und TgF-AFA-R9C mittels Phos-Tag™	49
Abbildung 27: Untersuchung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs in isolierten Kardiomyozyten aus dem remote Myokard 24 Stunden nach einstündiger Ischämie	51
Abbildung 28: Analyse der Proteinexpression von SERCA2a und PLN 24 Stunden nach einstündiger Ischämie.....	52
Abbildung 29: Analyse der Proteinexpression des kalziumregulatorischen Proteins S100A1 24 Stunden nach einstündiger Ischämie	53
Abbildung 30: Analyse der Proteinexpression von HAX-1 24 Stunden nach einstündiger Ischämie	53
Abbildung 31: Untersuchung des PLN-Phosphorylierungszustands an S16 und T17 24 Stunden nach einstündiger Ischämie	55
Abbildung 32: Der Anteil nicht phosphorylierter PLN-Monomere ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie signifikant erhöht	56
Abbildung 33: Phosphorylierungszustand von PLN (S16) in Kardiomyozyten des RM 24 Stunden nach einstündiger Ischämie nach Stimulation mit Isoproterenol (10^{-7} M).....	56
Abbildung 34: Die Aktivität und Proteinexpression der Proteinkinase A ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert.....	57
Abbildung 35: Untersuchung des Phosphorylierungszustands von RyR2 24 Stunden nach einstündiger Ischämie.....	58
Abbildung 36: Die PKA-abhängige Phosphorylierung von kardialem Troponin-I ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert	59

Abbildung 37: Die Proteinexpression von Proteinphosphatase-1 und Inhibitor-1 ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert 60

Abbildung 38: Die Aktivität der Proteinphosphatase 2A im RM ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie signifikant erhöht 61

Abbildung 39: Modell der SERCA2a-Regulation durch PLN-Pentamere..... 68

Abbildung 40: Modell der durch PLN-R9C verursachten übermäßigen SERCA2a-Inhibition 71

Abbildung 41 Modell der in der vorliegenden Arbeit identifizierten molekularen Mechanismen, welche zur funktionellen Einschränkung von Kardiomyozyten des remote Myokards führen 77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper. 26

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien. 27

Tabelle 3: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gerätschaften. 28

Tabelle 4: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Software. 28

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurin
BL	Basalbedingungen
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase II
CICR	<i>Calcium induced calcium release</i> , Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung
coIP	Ko-Immunopräzipitation
cTnI	Kardiales Troponin-I
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FLAG	N-terminale Markierung mit FLAG-Epitop (DYKDDDDK)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HAX-1	<i>HS1 associated protein X-1</i>
HEK293	Zelllinie <i>Human embryonal kidney 293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
I/R	Ischämie/Reperfusion
I-1	Proteinphosphatase-Inhibitor-1
I-2	Proteinphosphatase-Inhibitor-2
IB	Immunoblot
IP	Immunopräzipitation

ISO	Isoproterenol
LAD	<i>Left anterior descending, Ramus interventricularis anterior</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
LB	Luria-Bertani-Medium
LTC	L-Typ Kalziumkanal
MI	Myokardinfarkt
MPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
Myc	N-terminale Markierung mit Myc-Epitop
<i>Myh6</i>	<i>A-myosin heavy chain</i> -Promotor
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i	Anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLN	Phospholamban
PLN-AFA	Phospholamban AFA
PLN-AFA-R9C	Phospholamban AFA-R9C
PLN-KO	Phospholamban-defiziente Mauslinie
PLN-R9C	Phospholamban R9C
PMCA	Sarkolemmale Kalzium-ATPase
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2B	Proteinphosphatase 2B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RM	<i>Remote</i> Myokard
RyR2	Ryanodinrezeptor-2
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA2a	Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
Tg	Transgene Mauslinie

ZETT

Zentrale Einrichtung für Tierforschung und
wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1 Einleitung

Global sind etwa 26 Mio. Menschen von Herzinsuffizienz betroffen. In Europa und den USA gibt es jährlich mehr als eine Million Hospitalisierungen auf Grund von Herzinsuffizienz¹. Die geschätzten global verursachten wirtschaftlichen Kosten beliefen sich auf etwa 108 Milliarden \$US in 2012². Die Mortalität beläuft sich auf über 40 % bei einem 5-jährigen Beobachtungszeitraum³. Herzinsuffizienz stellt dabei die gemeinsame Endstrecke verschiedenster zugrunde liegender Erkrankungen dar. Ursachen hierfür umfassen unter anderem koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt in der Vergangenheit, Bluthochdruck, Myokarditis, Fettleibigkeit und Diabetes².

Neben diesen können auch genetische Veränderungen zur Herzinsuffizienz führen. Diese sind nur an einem geringen Teil aller Fälle von Herzinsuffizienz ursächlich beteiligt, sind jedoch in bestimmten Patientenpopulationen besonders häufig anzutreffen. Beispielsweise ist bei Kindern mit Herzinsuffizienz in etwa 40 % der Fälle eine genetische Ursache verantwortlich⁴. In einer Kohorte junger Erwachsener mit einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie und Bedarf für eine Herztransplantation konnte in 26 % der Fälle eine genetische Ursache gefunden werden⁵. Mutationen in Genen für Proteine mit einer Rolle in der Muskelkontraktion, der Kraftübertragung und der Regulation der Kontraktion sind hierbei besonders häufig betroffen. Dies zeigt die besondere Bedeutung dieser Proteine für die Aufrechterhaltung einer normalen Herzfunktion auf.

All diesen verschiedenen Ursachen gemeinsam ist, dass sie zu einer Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens führen. Mechanistisch beruht eine Reduktion der Herzleistung häufig auf Veränderungen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs⁶. Diese sind oft mit einer Abnahme der Kontraktilität assoziiert, was in der Folge zur Herzinsuffizienz fortschreiten kann⁷. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher auf die molekularen Vorgänge des Kalziumkreislaufs in Kardiomyozyten eingegangen werden.

1.1 Der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf und Kardiomyozytenkontraktion

1.1.1 Exzitations-/Kontraktionskopplung in Kardiomyozyten

Kardiomyozyten machen im adulten Säugetierherzen etwa 25-30 % der Zellen im Herzmuskel (Myokard) aus⁸. Bedingt durch ihre Größe kommen durch Kardiomyozyten jedoch ungefähr 70-85 % des Myokardvolumens zustande⁹. Durch ihre Kontraktionsfähigkeit sind sie hauptverantwortlich für die Pumpfunktion des Myokards. Dadurch ist ihre Funktion entscheidend für die Blutversorgung des gesamten Organismus.

Das intrazelluläre Signal, welches Kontraktion und Relaxation steuert, ist dabei die Konzentration von Kalziumionen im Zytosol. Das zyklische Ansteigen und Abfallen der zytosolischen Kalziumionenkonzentration mit jedem Herzschlag wird dabei als

kardiomyozytärer Kalziumkreislauf (engl. „*calcium cycling*“) bezeichnet. Eingeleitet wird dieser durch ein Aktionspotential, welches die Zelle erreicht.

Dadurch kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Kalziumkanäle (LTC) in der Plasmamembran (Abbildung 1, 1). In der Folge kommt es zum Einstrom von Kalziumionen in die Zelle. In räumlicher Nähe zu den L-Typ-Kalziumkanälen liegt intrazellulär in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) der Ryanodinrezeptor-2 (RyR2)¹⁰. RyR2 stellt ebenfalls einen Kalziumkanal dar. Der lokale Einstrom von Kalzium über die Plasmamembran bewirkt eine Öffnung von RyR2, was zum Ausstrom großer Mengen an Kalzium aus dem SR ins Zytosol führt (Abbildung 1, 2). Dieser Vorgang wird als Kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (engl. „*calcium induced calcium release*“, „CICR“) bezeichnet. Die Menge des freigesetzten Kalziums ist dabei wesentlich größer als die des initialen Kalziumeinstroms durch die L-Typ-Kalziumkanäle. Es kommt hierdurch zu einer etwa zehnfachen Erhöhung der

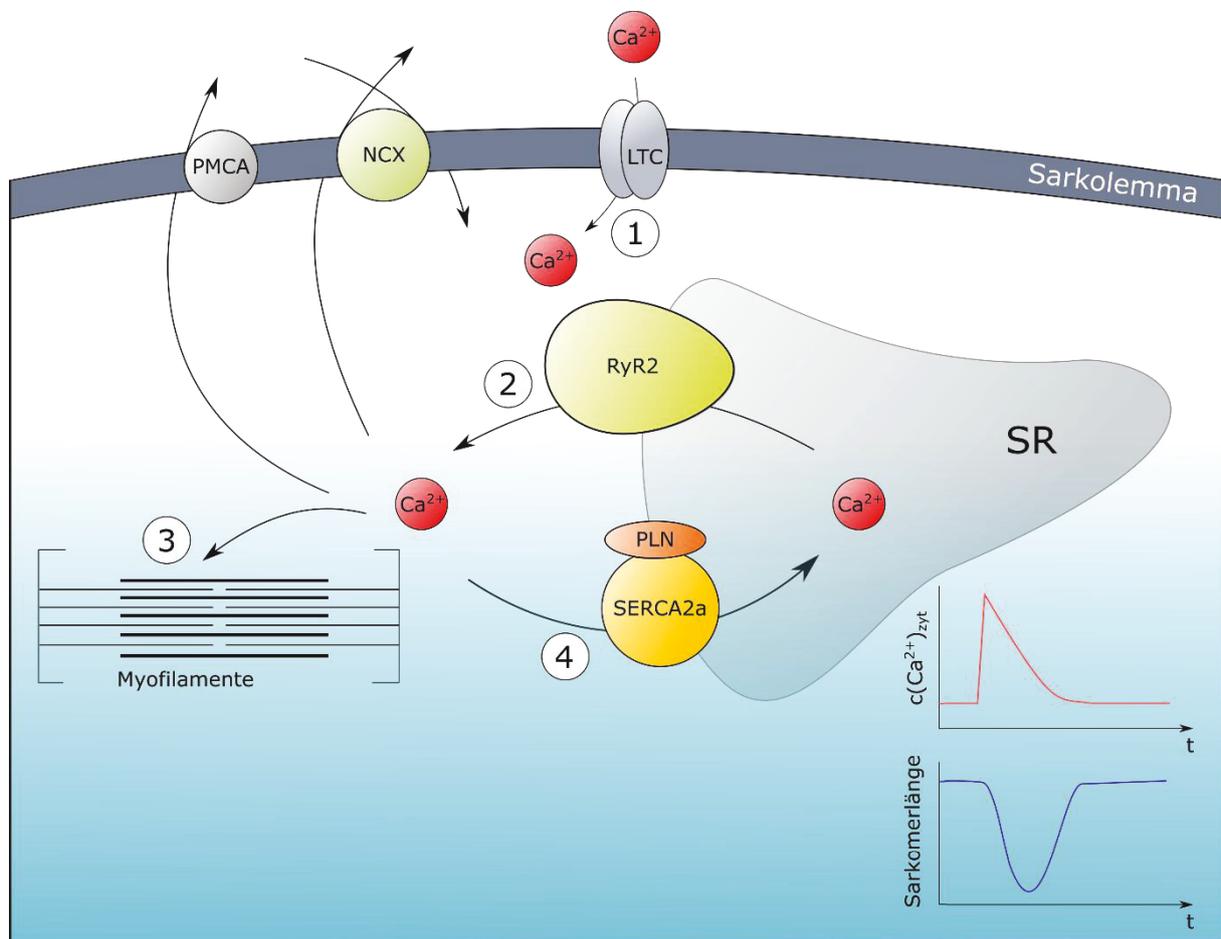


Abbildung 1 Schemazeichnung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs. Der Einstrom von Kalzium über L-Typ Kalziumkanäle (1) aktiviert die Kalziumfreisetzung aus dem SR über den Ryanodinrezeptor-2 (2). Der daraus resultierende starke Anstieg der zytosolischen Kalziumionenkonzentration bewirkt die Kontraktion der Myofilamente (3). Die Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol durch SERCA2a ermöglicht schließlich die Relaxation (4). Die Kalzium-ATPase der Plasmamembran und der Natrium-Kalzium-Austauscher tragen ebenfalls zu einem geringen Teil zur zytosolischen Kalziumelimination bei. Unten rechts: Darstellung der Beziehung zwischen zytosolischer Kalziumkonzentration und Kontraktion. Eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt dabei zur Verkürzung der Sarkomere. Ein Abfallen der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt die Relaxation. SR: Sarkoplasmatisches Retikulum, LTC: L-Typ Kalziumkanal, NCX: Natrium-Kalzium-Austauscher, PMCA: Sarkolemmale Kalzium-ATPase, RyR2: Ryanodinrezeptor-2, PLN: Phospholamban, SERCA2a: Kalzium-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{zyt}}$: Zytosolische Kalziumionenkonzentration.

zytosolischen Kalziumionenkonzentration¹⁰. Dieser starke Konzentrationsanstieg stellt schließlich das Signal für die Kontraktion der Myofilamente dar.

Die Myofilamente sind dabei in Sarkomeren organisiert, welche die kleinsten kontraktile Einheiten innerhalb der Kardiomyozyten darstellen. Innerhalb eines Sarkomers befinden sich dicke und dünne Filamente, welche sich aus kontraktile, strukturellen, sowie regulatorischen Proteinen zusammensetzen. Die dünnen Filamente bestehen im Wesentlichen aus Aktin. Sie sind über Aktinin mit den Z-Scheiben des Sarkomers verbunden. Die dicken Filamente bestehen überwiegend aus Myosin und sind über Titin an den Z-Scheiben verankert. Für die Steuerung von Kontraktion und Relaxation besitzen die regulatorischen Proteine Tropomyosin und der Troponinkomplex, bestehend aus Troponin-C, -T und -I, besondere Bedeutung. Diese Proteine verhindern im relaxierten Zustand die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumionenkonzentration, bindet Kalzium an Troponin-C. Die dadurch hervorgerufenen Konformationsänderungen des Troponinkomplexes führen schließlich dazu, dass der Tropomyosin-Doppelstrang in die Längsrinne der Aktin-Doppelhelix verschoben wird. Dadurch werden die Bindestellen für Myosin freigelegt und

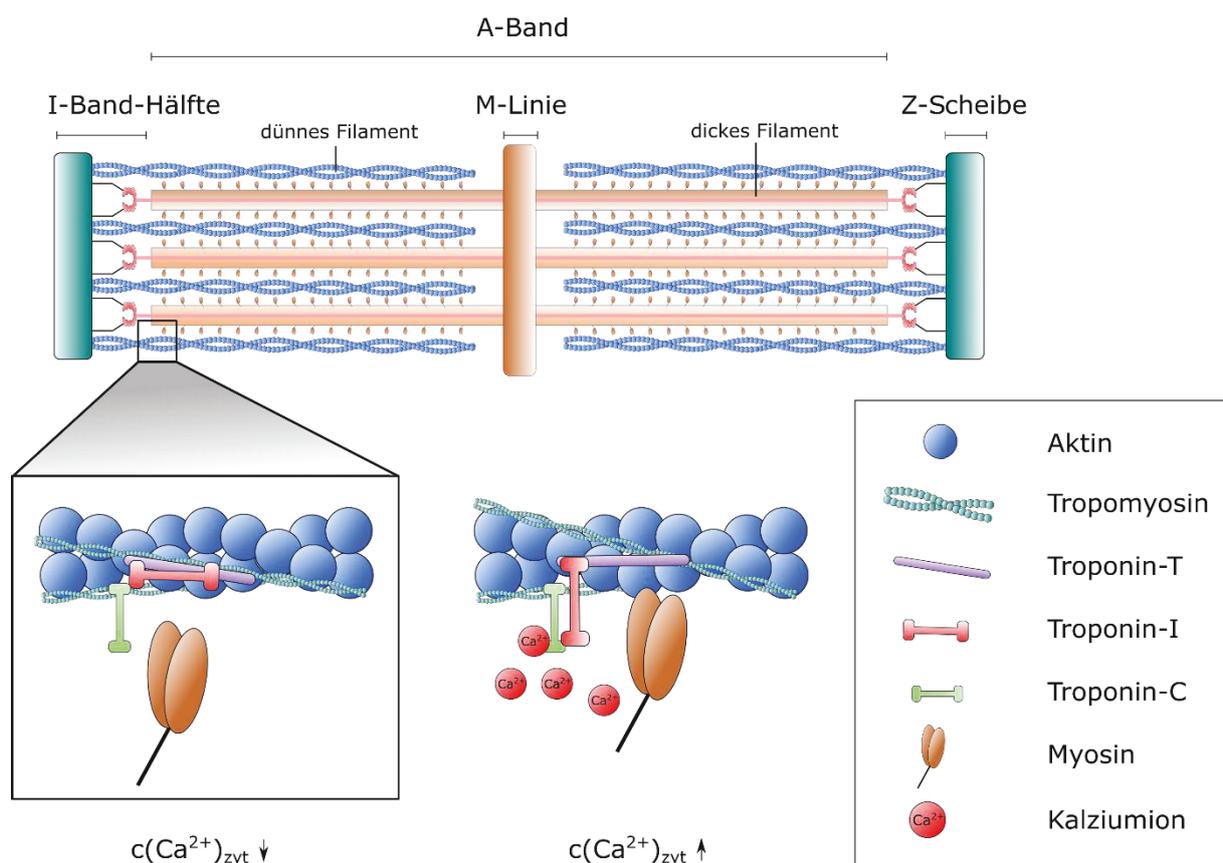


Abbildung 2 Schemazeichnung der Vorgänge im Sarkomer während der Kontraktion. Bei diastolischen zytosolischen Kalziumkonzentrationen verhindern Tropomyosin und der Troponinkomplex aus Troponin-T, -I und -C die Interaktion zwischen Aktin und Myosin. Die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt zur Bindung von Kalzium an Troponin-C und einer damit einhergehenden Konformationsänderung des Troponinkomplexes. In der Folge wird der Tropomyosin-Doppelstrang in die Längsrinne der Aktin-Doppelhelix verschoben. Dadurch werden die Interaktionsstellen zwischen Aktin und Myosin freigelegt und es kommt zur Interaktion der beiden Proteine, was zur Verschiebung von dicken und dünnen Filamenten gegeneinander und somit zur Kontraktion führt. $c(\text{Ca}^{2+})_{\text{zyt}}$: Zytosolische Kalziumionenkonzentration.

es kommt zur Aktin-Myosin-Interaktion, welche zur Verschiebung von dicken und dünnen Filamenten gegeneinander führt, sodass eine Kontraktion resultiert (Abbildung 2). Da diese Prozesse an vielen Sarkomeren gleichzeitig ablaufen, kommt es in der Folge zur Kontraktion der gesamten Zelle (Abbildung 1, 3). Die Relaxation wird schließlich durch die Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol eingeleitet (Abbildung 1, 4). Dabei pumpt die Kalzium-ATPase SERCA2a den Großteil des Kalziums zurück ins SR. Die Geschwindigkeit, mit der Kalzium aus dem Zytosol entfernt wird, wird dabei maßgeblich durch Phospholamban (PLN) moduliert, welches im aktiven Zustand einen Inhibitor von SERCA2a darstellt.

1.1.2 Regulation der Kontraktion und des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs durch β -adrenerge Signale

Die Kontraktion und der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf können an verschiedenen Stellen durch posttranslationale Modifikationen beteiligter Proteine reguliert werden. Hierbei sind insbesondere β -adrenerge Signale für die kurzfristige Anpassung der Herzleistung an den Bedarf des Organismus von Bedeutung. In der Plasmamembran von Kardiomyozyten finden sich überwiegend adrenerge β -Rezeptoren. Diese gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Intrazellulär finden sich bei dieser Rezeptorfamilie assoziierte heterotrimere G-Proteinkomplexe, welche die intrazelluläre Signalweiterleitung vermitteln. Diese bestehen aus den Untereinheiten α , β und γ , welche sich auf Grundlage der von ihnen vermittelten Effekten unterteilen lassen. Je nach assoziierten G-Proteinen werden intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt. β -adrenerge Rezeptoren koppeln hierbei an die Untereinheit $G\alpha_s$, welche stimulierende Effekte in der Zelle hervorruft. Die $G\alpha_s$ -Untereinheit bindet im Ruhezustand des Rezeptors GDP. Durch Bindung agonistischer Rezeptorliganden kommt es zu Konformationsänderungen des Rezeptors, welche dazu führen, dass das GDP durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren gegen GTP ausgetauscht wird. Dadurch kommt es zur Dissoziation des Heterotrimers aus α -, β - und γ -Untereinheit in aktiviertes $G\alpha$ und $G\beta\gamma$. $G\alpha_s$ stimuliert anschließend die Aktivität der Adenylatzyklase, welche die Bildung des sekundären Botenstoffes zyklisches AMP (cAMP) aus ATP katalysiert. Durch Aktivierung der Adenylatzyklase kommt es zu einem Anstieg der Konzentration von cAMP, das zur Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) führt. PKA ist eine heterotetramere Serin-/Threonin-Kinase, die aus je zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten besteht. Die regulatorischen Untereinheiten sind dabei in der Lage, jeweils zwei cAMP-Moleküle zu binden. Die Bindung von cAMP führt zur Freisetzung und damit Aktivierung der katalytischen Untereinheiten. PKA besitzt eine große Zahl an verschiedenen Zielproteinen, deren Aktivität durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung moduliert werden kann. PKA-Zielproteine mit Schlüsselfunktionen im kardiomyozytären Kalziumhaushalt und der Kontraktion sind hierbei beispielsweise PLN, RyR2, cTnI und der

L-Typ Kalziumkanal. Die PKA-abhängige Phosphorylierung von PLN führt zu einer Inaktivierung und damit zu einer Aufhebung des inhibitorischen Effekts gegenüber SERCA2a. Somit kommt es zu einer Steigerung der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination und in der Folge zu einer erhöhten Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards. Darüber hinaus wird hierdurch die Menge des im SR gespeicherten Kalziums gesteigert, sodass mehr Kalzium für die folgende Kontraktion zur Verfügung steht. Da das Ausmaß der Sarkomerkontraktion von der Konzentration des freien zytosolischen Kalziums abhängt, kommt es durch die vermehrte Freisetzung von Kalzium zu einer gesteigerten Kraftentwicklung der Myofilamente (positive Inotropie). Neben dem kardiomyozytären Kalziumkreislauf kann auch die Kontraktilität der Myofilamente durch β -adrenerge Stimulation moduliert werden. Hierbei stellt cTnI einen Schlüsselregulator der Kontraktilität dar. Die PKA-abhängige Phosphorylierung von cTnI an den Serinresten 23 und 24 bewirkt eine Verringerung der Kalziumsensitivität der Myofilamente und eine beschleunigte Dissoziation von Kalzium und Troponin-C. Dadurch trägt auch der Phosphorylierungszustand von cTnI zur positiven Lusitropie einer β -adrenergen Stimulation bei. Zusammengenommen bewirkt eine β -adrenerge Aktivierung durch diese und weitere Mechanismen eine Steigerung der Kontraktionskraft (positive Inotropie) und eine Beschleunigung der Relaxationsgeschwindigkeit (positive Lusitropie). Dadurch stellen β -adrenerge Signale einen zentralen Regulationsmechanismus zur Anpassung der Herzleistung an den Bedarf des Organismus dar.

1.2 Molekulare Vorgänge in Kardiomyozyten während der kardialen Relaxationsphase

An der Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol sind verschiedene Kalziumtransportsysteme beteiligt, wobei der Großteil des Kalziums durch SERCA2a eliminiert wird. In Mausherzen liegt ihr Anteil an der Elimination des zytosolischen Kalziums bei etwa 92 %. Neben SERCA2a ist vor allem der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) an der Elimination des Kalziums beteiligt. In murinen Kardiomyozyten trägt er zu etwa 7 % zur zytosolischen Kalziumelimination bei. Die verbleibenden 1 % werden durch die sarkolemmale Kalzium-ATPase (PMCA) und den mitochondrialen Uniporter eliminiert. Die prozentualen Anteile der verschiedenen Wege, über die Kalzium aus dem Zytosol eliminiert wird, unterscheiden sich zwischen murinen und humanen Kardiomyozyten. Dennoch ist SERCA2a auch in humanen Kardiomyozyten quantitativ am bedeutsamsten (70 % SERCA2a, 28 % NCX, 1 % PMCA, 1 % mitochondrialer Uniporter)⁷. Da die kardiale Relaxationsphase wesentlich durch die Aktivität von SERCA2a geprägt wird, soll im Folgenden näher auf Struktur, Funktion und Regulation dieser Kalzium-ATPase eingegangen werden.

1.2.1 SERCA2a

Die Kalzium-ATPase SERCA2a ist ein etwa 110 kDa großes, Magnesium-abhängiges Enzym, welches in der Membran des SR lokalisiert ist. SERCA2a pumpt Kalzium unter Verbrauch von ATP vom Zytosol über die Membran zurück ins SR. Dabei werden pro Molekül ATP zwei Kalziumionen entgegen des Kalziumkonzentrationsgradienten transportiert. SERCA2a gehört zur Familie der P-Typ ATPasen Typ II¹¹ und wird durch das Gen *SERCA2* kodiert. Durch alternatives Spleißen des Transkripts bringt dieses Gen zwei Proteinprodukte, SERCA2a und SERCA2b, hervor. Dabei stellt SERCA2a die in Kardiomyozyten überwiegend exprimierte Form dar. SERCA2b ist hier sehr schwach exprimiert und trägt dadurch nur wenig zur Elimination des Kalziums aus dem Zytosol bei.

SERCA2a ist in vier definierten Proteindomänen organisiert: Der P-, N-, A-, und M-Domäne (Abbildung 3). Die P-Domäne enthält dabei einen maßgeblich an der Enzymfunktion beteiligten Aspartatrest, auf welchen während des katalytischen Zyklus ein Phosphatrest übertragen wird. Diese Domäne ist evolutionär hochkonserviert und verleiht der Familie der P-Typ ATPasen ihren Namen. In der nukleotidbindenden N-Domäne bindet ATP mit seinem Adenosinteil in einer Tasche des Enzyms. Die Triphosphatgruppe ragt dabei aus der Tasche heraus. Somit ist die γ -Phosphatgruppe zugänglich für den Aspartatrest der P-Domäne, sodass die Übertragung der Phosphatgruppe erfolgen kann. Die aminoterminalen A-Domäne enthält keinerlei Bindestellen für Kofaktoren oder Ionen. Ihre funktionelle Relevanz ist nicht abschließend geklärt. Die M-Domäne umfasst schließlich den transmembranären Anteil des Enzyms. Sie besteht aus 10 Transmembranhelices (M1-10), welche die Ionenbindestellen des Enzyms umgeben. Aminosäureseitenketten dieser Helices sind maßgeblich an der Bindung und Translokation von Kalzium über die Membran beteiligt¹². Im Grundzustand (Abbildung 3, E1) sind die Kalzium-Bindestellen nur vom Zytosol aus für Kalziumionen zugänglich. Nach Bindung von zwei Kalziumionen erfolgt die Hydrolyse von einem Molekül ATP zu ADP. Hierbei wird der terminale Phosphatrest des ATP auf einen Aspartatrest im katalytischen Zentrum des Enzyms übertragen (Abbildung 3, E1-P). Dadurch kommt es zu reversiblen Konformationsänderungen, welche dazu führen, dass Kalzium ins SR freigesetzt wird (Abbildung 3, E2-P). Anschließend folgt die hydrolytische Abspaltung des Phosphatrests (Abbildung 3, E2). Die E2-Konformation erlaubt keine Kalziumbindung, sodass zunächst der Übergang zum Grundzustand E1 erfolgen muss, damit ein neuer katalytischer Zyklus durchlaufen werden kann¹³. Die Aktivität des Enzyms und damit die Geschwindigkeit, mit welcher Kalzium aus dem Zytosol entfernt wird, kann variieren. So haben beispielsweise Veränderungen des zellulären Kalziumgehalts, des pH-Werts und ATP-, ADP- und P_i-Konzentrationen Auswirkungen auf die Aktivität. Darüber hinaus kann die Aktivität von SERCA2a direkt durch interagierende Proteine reguliert werden. Dadurch kann die

Geschwindigkeit der Entfernung des zytosolischen Kalziums und damit die Relaxationsgeschwindigkeit an den jeweiligen Bedarf angepasst werden.

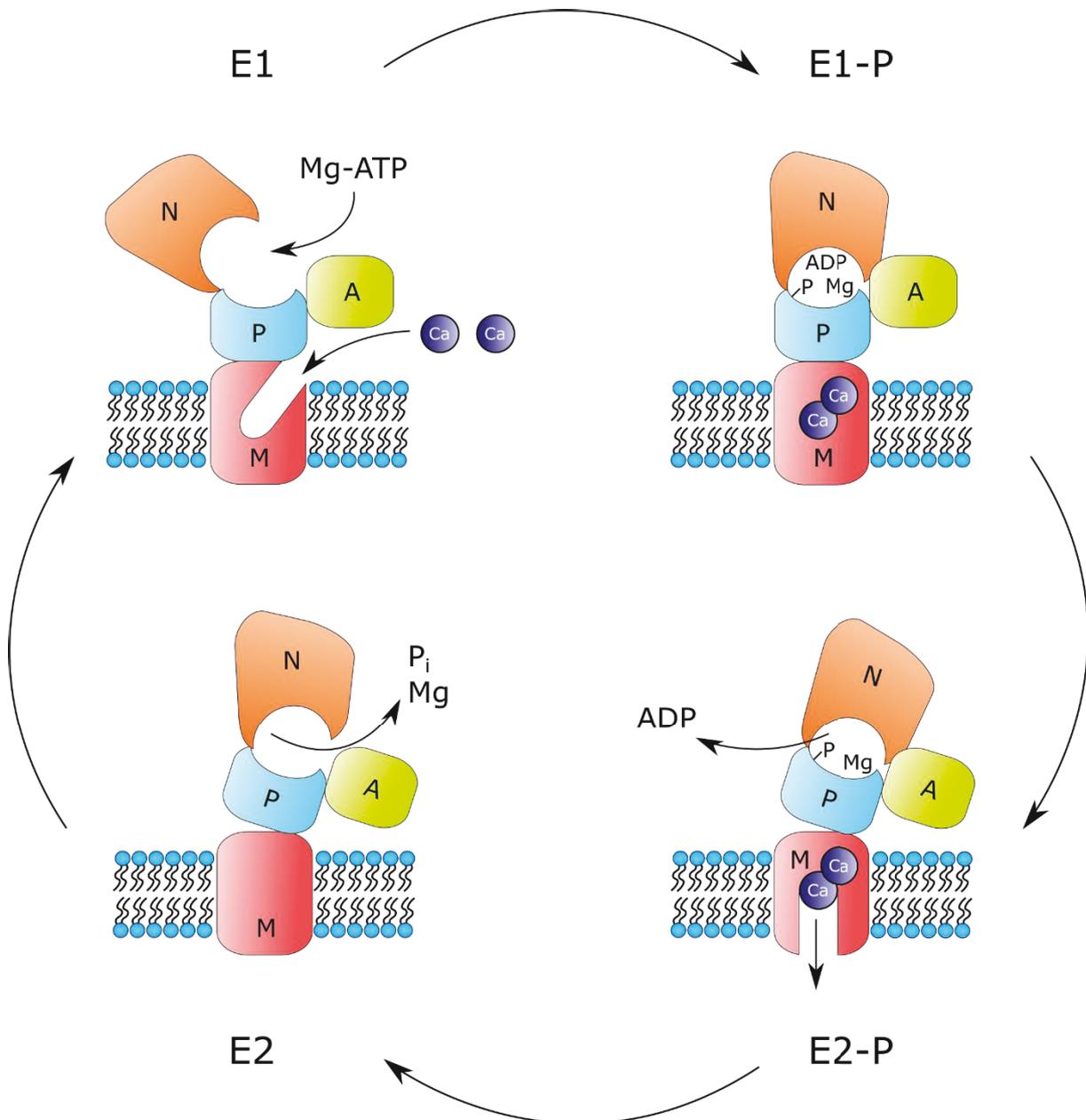


Abbildung 3 Schemazeichnung des katalytischen Zyklus der Familie der P-Typ ATPasen. P: P-Domäne, N: Nukleotidbindende N-Domäne, A: Aminoterminaler Domäne, M: Transmembranäre M-Domäne, ATP: Adenosindtriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, Ca: Kalziumionen, -P: Phosphatgruppe, Mg: Magnesiumion, Pi: Anorganisches Phosphat; E1, E1-P, E2-P und E2 bezeichnen die verschiedenen Übergangszustände des Enzyms im Verlauf des katalytischen Zyklus. Abbildung modifiziert nach [11].

1.2.2 Regulation der SERCA2a-Aktivität durch Phospholamban

Phospholamban (PLN) stellt einen wichtigen Regulator der SERCA2a-Aktivität dar. Dadurch ist PLN entscheidend an der Regulation der Relaxationsgeschwindigkeit, der Kontraktilität und der Kalziumbeladung des SR beteiligt¹⁴. PLN ist ein 52 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von ~6,1 kDa, welches als Inhibitor der Aktivität von SERCA2a fungiert. PLN

besteht aus drei Domänen, den zytosolischen Domänen Ia (Aminosäure 1-20) und Ib (Aminosäure 21-30) und einer Transmembrandomäne (Aminosäure 31-52). Die Transmembrandomäne spielt dabei eine wichtige Rolle für die Regulation der Aktivität von SERCA2a¹⁵. Sie durchspannt, wie auch die Transmembrandomänen von SERCA2a, die Membran des SR. Die Protein-Protein-Interaktion von PLN mit SERCA2a führt dabei zu einer Verringerung der apparenten Kalziumaffinität des Enzyms. Mechanistisch stabilisiert PLN dabei die E2-Konformation von SERCA2a, in welcher kein Kalzium gebunden vorliegt. Dadurch verlängert PLN die Verweildauer von SERCA2a in der E2-Konformation. In der Folge wird Kalzium langsamer aus dem Zytosol eliminiert und die Relaxationsgeschwindigkeit nimmt ab^{16,17}.

1.2.3 Regulation der inhibitorischen Aktivität von Phospholamban durch Kinasen

Die inhibitorische Aktivität von PLN gegenüber SERCA2a ist vom Phosphorylierungszustand der beiden Aminosäureseitenketten S16 und T17 abhängig. S16 und T17 befinden sich frei zugänglich für Kinasen und Phosphatasen in der zytosolischen Domäne Ia. Die Modifikation dieser Aminosäureseitenketten durch Kinasen führt zur Aufhebung des inhibitorischen Effekts gegenüber SERCA2a. In der Folge kommt es zu einer Steigerung der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination und damit zu einem positiv lusitropen Effekt. Eine β -adrenerge Aktivierung der Zelle und der damit verbundene Anstieg der Konzentration von cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese phosphoryliert PLN an S16. Neben PLN werden mehrere weitere kalziumregulierende Proteine, wie z. B. RyR2 und der L-Typ Kalziumkanal, durch PKA phosphoryliert. Dadurch erhöhen sich der Kalziumeinstrom in die Zelle und die Kalziumfreisetzung aus dem SR. Die daraus resultierende erhöhte mittlere zytosolische Kalziumkonzentration trägt zu einer höheren Aktivität von Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) bei¹⁰, welche PLN an T17 phosphoryliert. Für die Aufhebung der SERCA2a-Inhibition ist vor allem der Phosphorylierungszustand von S16 von Bedeutung. Die alleinige Modifikation dieser Aminosäureseitenkette führt zur vollständigen Aufhebung der PLN-vermittelten SERCA2a-Inhibition, während nach alleiniger Phosphorylierung von T17 eine gewisse Inhibition erhalten bleibt¹⁸. Die Phosphorylierung an S16 führt dabei nicht zur Dissoziation des SERCA2a-PLN-Komplexes. Stattdessen beruht die Aufhebung der SERCA2a-Inhibition auf Konformationsveränderungen der zytosolischen Domäne von PLN in Folge der Phosphorylierung. Im Zuge dessen wird die zytosolische Domäne ungeordneter, sodass für die Inhibition relevante intermolekulare Kontakte zwischen den beiden Proteinen gestört werden¹⁹⁻²¹. Die Dephosphorylierung führt schließlich zu einer Wiederherstellung der SERCA2a-Inhibition durch PLN.

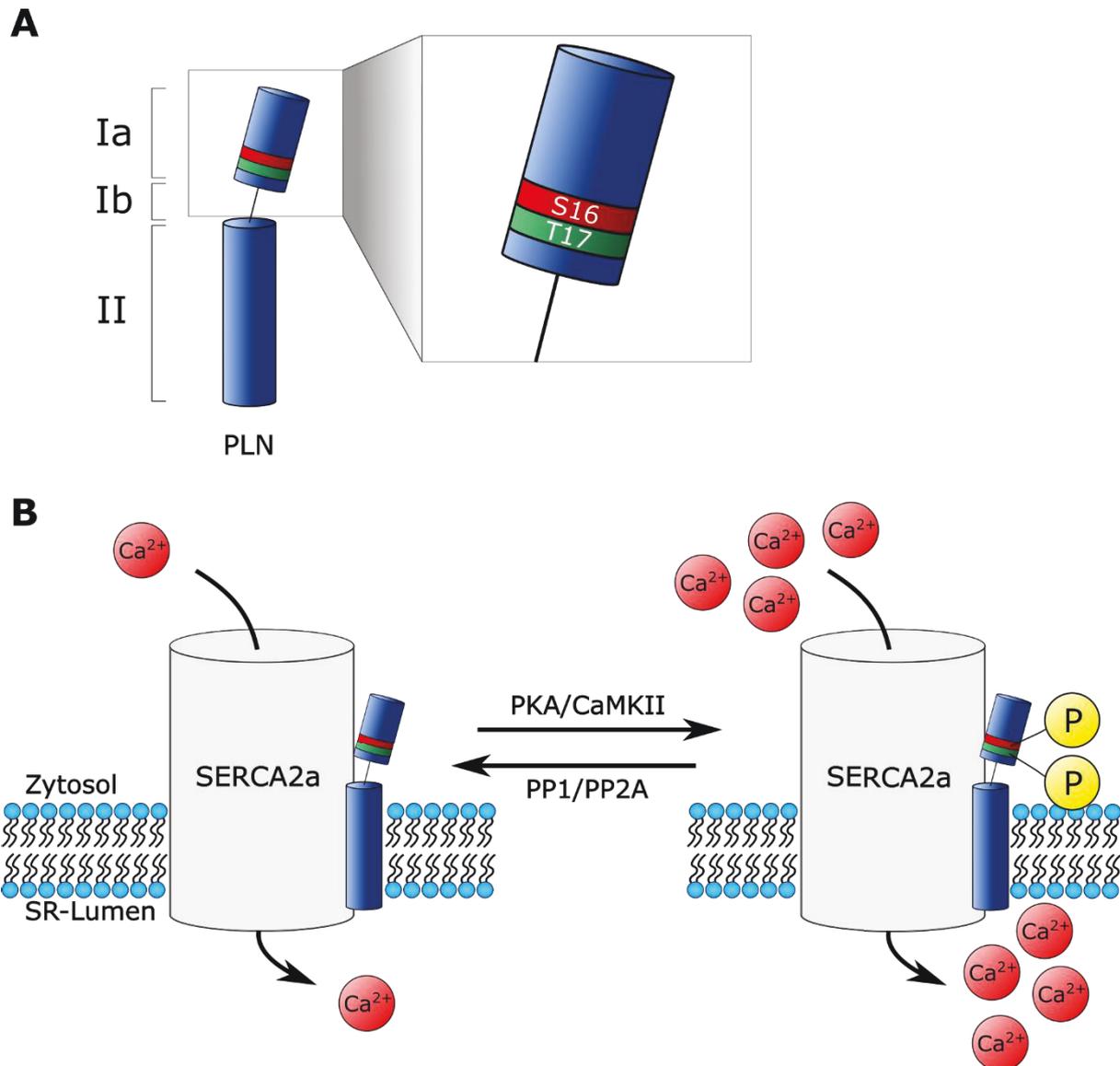


Abbildung 4 Regulation der PLN-vermittelten SERCA2a-Inhibition durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung. A: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des PLN-Proteins. S16: PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle, T17: CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle. B: Die Phosphorylierung von PLN an S16 oder beiden Phosphorylierungsstellen (S16 und T17) führt zur Aufhebung der PLN-vermittelten Inhibition von SERCA2a. PLN: Phospholamban, SERCA2a: Kalzium-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, PKA: Proteinkinase A, CaMKII: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II, PP1/PP2A: Proteinphosphatase 1 bzw. 2A, P: Phosphatrest.

1.2.4 Regulation des Phosphorylierungszustands von Phospholamban durch Phosphatasen

Proteinphosphatasen (PP) stellen ein wichtiges regulatorisches System in Kardiomyozyten dar. Sie spalten die Phosphatgruppen, welche durch Proteinkinasen angehängt wurden, wieder ab. Somit werden Phosphorylierungsvorgänge durch Phosphatasen reversibel. Dabei gibt es verschiedene Phosphatasefamilien. In Kardiomyozyten spielen vor allem Serin-/Threoninphosphatasen eine große Rolle. Etwa 90 % aller Dephosphorylierungsvorgänge werden in Kardiomyozyten durch die Serin-/Threoninphosphatasen PP1, PP2A und PP2B katalysiert²². Für die Dephosphorylierung von PLN sind hauptsächlich PP1 und PP2A verantwortlich. Die Aktivität dieser beiden

Phosphatasen ist in Kardiomyozyten für etwa 93 % der PLN-Dephosphorylierung verantwortlich. PP1 stellt hierbei die hauptsächlich für die Dephosphorylierung von PLN verantwortliche Phosphatase dar. PP2A trägt hierzu etwa 30 % bei²³. Die Dephosphorylierung von PLN führt zu dessen Aktivierung, sodass eine verstärkte SERCA2a-Inhibition resultiert. Die Substratspezifität, Aktivität und subzelluläre Lokalisation von PP1 und PP2A werden durch ihre Interaktion mit einer Vielzahl verschiedener Untereinheiten bestimmt. Dabei bildet PP1 Heterodimere mit je einer von über 150 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten. Der am besten untersuchte negative Regulator der PP1-Aktivität ist der Proteinphosphatase-Inhibitor-1 (I-1). Die inhibitorische Aktivität von I-1 hängt vom Phosphorylierungszustand verschiedener aktivierender und deaktivierender Phosphorylierungsstellen ab. Die PKA-abhängige Phosphorylierung an T35 ist Voraussetzung für die Inhibition der PP1-Aktivität²⁴. Die Phosphorylierung der Stellen S67 und T75 durch Proteinkinase C α (PKC α) führt dagegen zu einer Inaktivierung von I-1 und damit zu einer gesteigerten Aktivität von PP1 in Kardiomyozyten²⁵⁻²⁷. Der PKA-abhängigen Phosphorylierung an T35 wirken dabei die Phosphatasen PP2A und PP2B entgegen, sodass ein Crosstalk zwischen PP1 und PP2A/PP2B besteht²⁸. I-1 entfaltet seine inhibitorische Aktivität *in vivo* vorwiegend am SR, wo er unter anderem den Phosphorylierungszustand von PLN und RyR2 moduliert²⁹. Das PP2A-Holoenzym besteht entweder aus einem Dimer zwischen einer katalytischen und einer strukturellen Untereinheit, oder aus einem Trimer aus katalytischer, struktureller und einer regulatorischen Untereinheit³⁰. Diese Fülle kombinatorischer Möglichkeiten der Bildung des Holoenzym ermöglicht die komplexe Integration von Signalen und die subzellulär begrenzte Regulation von Proteinaktivitäten.

1.2.5 Die Oligomerisierung von Phospholamban und dessen Bedeutung für die Inhibition von SERCA2a

Phospholamban liegt in einem Gleichgewicht zwischen Monomeren und Pentameren vor³¹⁻³³. In Lipidumgebungen besitzen Pentamere dabei eine windradartige Struktur^{34,35}, welche auch unter dem Einfluss von SDS stabil ist und somit mittels SDS-PAGE detektiert werden kann^{36,37}. Die Pentamerbildung erfolgt dabei nicht-kovalent, unter Beteiligung von Leucin-, Isoleucin- und Cysteinresten in den Transmembrandomänen. Stabilisiert werden Pentamere dabei durch Leucin/Isoleucin-*zipper*-Strukturen^{31,38,39}. Dabei handelt es sich um Struktur motive, die in α -Helices durch die regelmäßige Anordnung von Leucin bzw. Isoleucin zustande kommen und eine Verzahnung mit ähnlichen oder gleichen Strukturen eines anderen Proteins eingehen. Im Falle von PLN kommt es dadurch zu einer Oligomerisierung der Transmembranregionen mehrerer PLN-Protomere. In der Transmembrandomäne befinden sich 14 Leucin- und Isoleucinreste. Die Aminosäuren L37, I40, L44, I47 und L51 sind an der Bildung dieser *zipper*-Strukturen beteiligt³⁸. Darüber hinaus sind insbesondere die Cysteinreste an den Positionen 36, 41 und 46 von entscheidender Bedeutung für die Stabilität von Pentameren^{40,41}.

Trotz großer räumlicher Nähe dieser Cysteinreste innerhalb eines Pentamers, kommt es nicht zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Werden diese drei Cysteine durch Alanin (A36, A41, A46)⁴¹, bzw. Alanin (A36), Phenylalanin (F41) und Alanin (A46) ausgetauscht⁴², resultiert aus den sterischen Veränderungen an der α -Helix eine vollständige Unterdrückung der Bildung von Pentameren.

Es konnte gezeigt werden, dass Monomere die SERCA2a-inhibitorische Form von Phospholamban darstellen^{32,43-46}. Trotz dessen, dass Pentamere ebenfalls eine Bindung mit SERCA2a eingehen, inhibieren Pentamere die SERCA2a nicht oder allenfalls sehr schwach³². Für Pentamere wurden dabei zwei verschiedene Bindestellen an SERCA2a beschrieben, welche sich von der Bindestelle der Monomere unterscheiden⁴⁶⁻⁴⁸. Pentamere binden dabei an die Helix M3 der SERCA2a-Transmembrandomäne. Eine weitere Bindestelle befindet sich im C-terminalen Bereich von SERCA2a⁴⁷. Monomere binden dagegen in einer Furche, die unter Beteiligung der Helices M2, M4, M6 und M9 gebildet wird^{45,49,50}. Die funktionelle Relevanz der PLN-Pentamere ist derzeit Diskussionsgegenstand. Es wurde bisher eine Funktion in der Speicherung inaktiver, phosphorylierter PLN-Monomere postuliert^{32,37,51,52}. Dagegen konnte gezeigt werden, dass eine überwiegend als Monomer vorliegende

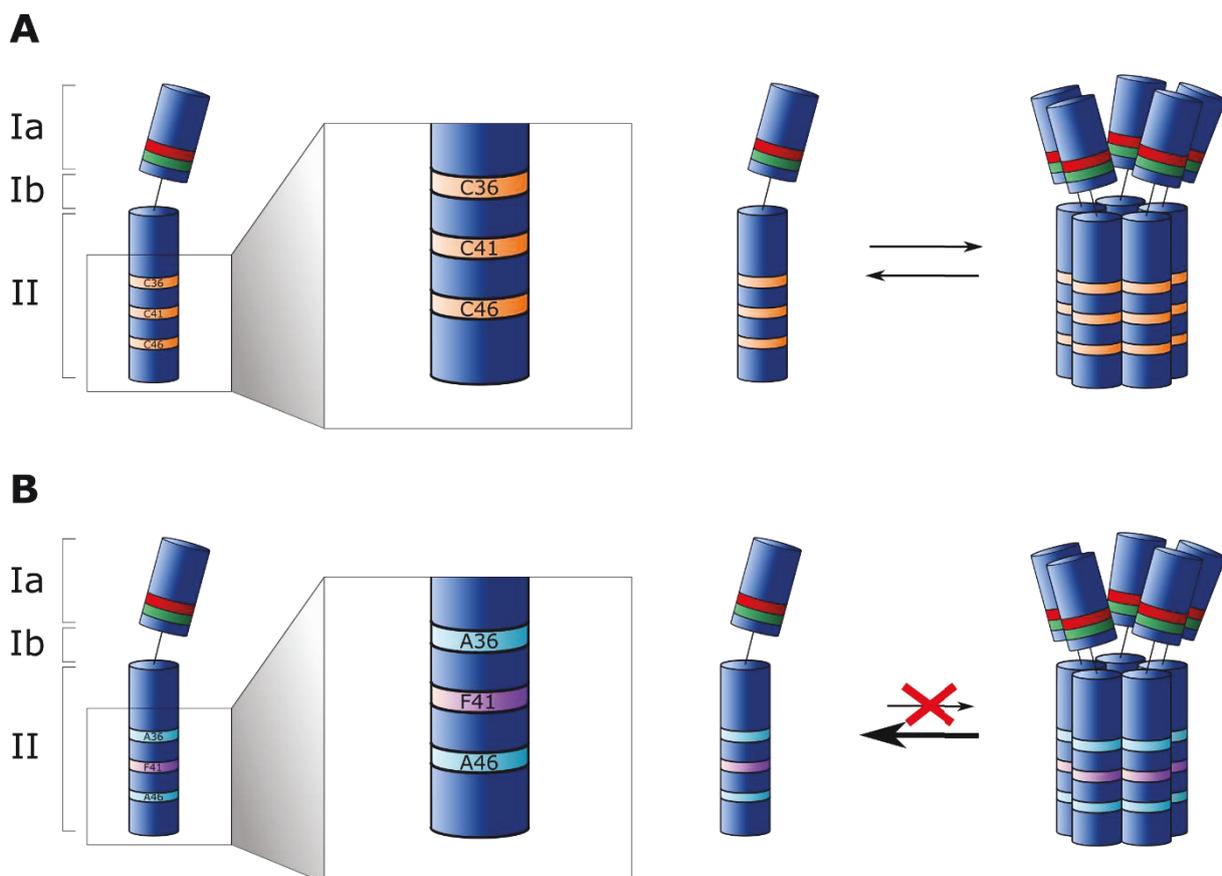


Abbildung 5 Die Cysteinreste 36, 41 und 46 sind kritisch für die Oligomerisierung von PLN. A: Schematische Darstellung der Lokalisation der Cysteinreste 36, 41 und 46 im PLN-Protein. B: Schematische Darstellung der rein monomeren PLN-Mutante PLN-AFA, in welcher die drei an der Oligomerisierung beteiligten Cysteinreste durch Alanin, Phenylalanin und Alanin ausgetauscht sind (A36, F41, A46). Diese Mutationen führen zur Unterdrückung der Bildung von PLN-Pentameren.

PLN-Mutante mit vergleichbarer Inhibitionsstärke wie das Wildtyp-Protein nur unzureichend in der Lage war, die kardiale Kontraktilität *in vivo* zu regulieren⁵³. Zusammengenommen liefern diese Befunde einen Hinweis darauf, dass die physiologische Rolle von PLN-Pentameren über eine rein passive Speicherfunktion inaktiver Monomere hinausgeht.

1.2.6 Die Phospholamban-Mutation „R9C“

Die herausragende Bedeutung einer intakten Regulation der Kalziumhomöostase der Herzmuskelzellen dokumentiert die Tatsache, dass Punktmutationen in kalziumregulierenden Proteinen schwerwiegende Funktionsstörungen des gesamten Herzens und terminale Herzinsuffizienz verursachen können. Für PLN sind einige klinisch relevante Mutationen in Menschen gefunden worden, welche zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie führen. Die Mechanismen, durch welche PLN-Mutationen schließlich zur Ausprägung einer Herzerkrankung führen, sind jedoch nur teilweise verstanden. Häufig führen die Mutationen zu einer abnormalen Regulation der SERCA2a-Aktivität⁵⁴ und in der Folge kommt es zu einem veränderten kardiomyozytären Kalziumkreislauf. Dabei sind Mutationen beschrieben, die die PLN-Funktion entweder verstärken oder abschwächen. Die R9C-Mutation, bei der Arginin an Position 9 gegen ein Cystein ausgetauscht ist, führt zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts von Wildtyp-PLN gegenüber SERCA2a. Betroffene Menschen entwickeln typischerweise in der 2. oder 3. Lebensdekade eine rasch progrediente Kardiomyopathie, die ohne Herztransplantation in der Mehrzahl der Fälle bereits vor dem 30. Lebensjahr zum Tod durch Herzversagen führt. Mechanistisch führt die R9C-Mutation zu einer verstärkten Protein-Protein-Interaktion mit PKA. Es wird vermutet, dass es durch diese verstärkte Interaktion der PKA es zu einer verminderten Phosphorylierung von wildtypischem PLN kommt, was in einer übermäßigen Inhibition von SERCA2a resultiert⁵⁵.

1.2.7 Weitere Regulatoren der SERCA2a-Aktivität

1.2.7.1 *HS1 associated protein X-1 (HAX-1)*

HAX-1 ist ein weiteres Protein, welches an der Regulation der SERCA2a-Aktivität beteiligt ist. HAX-1 interagiert mit PLN und verstärkt die durch PLN vermittelte Inhibition von SERCA2a⁵⁶. In einem konditionellen, kardiomyozytenspezifischen HAX-1 *knockout*-Modell konnte gezeigt werden, dass HAX-1 die SERCA2a-Inhibition durch PLN um etwa 50 % verstärkt⁵⁷. Die Phosphorylierung von PLN, sowie eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führen dabei zu einer Aufhebung der PLN-HAX-1-Interaktion⁵⁶. Neben direkten regulatorischen Effekten auf die Aktivität von SERCA2a, scheint HAX-1 auch an der Regulation der SERCA2a-Proteinexpression beteiligt zu sein⁵⁸. Darüber hinaus ist HAX-1 in der Mitochondrienmembran lokalisiert, wo es antiapoptotische Effekte durch die Inhibition von Caspase-9 besitzt⁵⁹.

1.2.7.2 S100A1

S100A1 stellt einen weiteren Regulator der SERCA2a-Aktivität dar. Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches intrazellulär als Kalziumsensor fungiert⁶⁰. S100A1 besitzt zwei Kalziumbindestellen. Die Bindung von Kalzium an diese Bindestellen führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch eine hydrophobe Tasche freigelegt wird. Diese dient der Bindung und Erkennung von Zielproteinen⁶¹. In der Folge kann S100A1 an eine Vielzahl von Proteinen binden und deren Aktivität somit kalziumabhängig modulieren. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass S100A1 kalziumabhängig mit dem SERCA2a/PLN-Komplex interagiert und die Aktivität von SERCA2a steigern kann⁶²⁻⁶⁴. Zudem wurde gezeigt, dass S100A1 den Kalziumgehalt des SR, die Geschwindigkeit der Kalziumaufnahme ins SR und die zytosolische Kalziumkonzentrationen während der Systole positiv moduliert⁶⁵. Dabei verändert S100A1 weder die Stöchiometrie der SERCA2a/PLN-Bindung, noch den Phosphorylierungszustand von PLN an S16 oder T17⁶⁶. Neben der Modulation der SERCA2a-Aktivität beeinflusst S100A1 den kardiomyozytären Kalziumkreislauf und die Kontraktilität auf vielfältige Art und Weise. So interagiert S100A1 mit RyR2 und beeinflusst dessen Öffnungswahrscheinlichkeit^{64,67,68}. Darüber hinaus ist S100A1 auch im Sarkomer lokalisiert, wo es die Kalziumsensitivität und Kalziumkooperativität der Myofilamente verringern kann⁶⁶.

1.3 Myokardinfarkt

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung waren ischämische Herzerkrankungen im Jahre 2015 laut WHO Todesursache Nummer eins, sowohl global als auch in Europa oder den USA. Ursache für einen akuten Myokardinfarkt (MI) ist dabei in der Regel eine thrombotische Okklusion einer epikardialen Koronararterie in Folge einer Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques. Dadurch kommt es zu einer transmuralen Ischämie und damit einhergehender Schädigung des Gewebes⁶⁹. Aktuelle Therapieansätze verfolgen das Ziel, die Okklusion des betroffenen Gefäßes möglichst schnell zu beseitigen und die Perfusion des Gewebes wiederherzustellen. Eine rasche Reperfusion reduziert dabei die Größe des Infarktgebietes und führt zu einer besseren Prognose für die Patienten^{70,71}. Frühe Folge einer Ischämie/Reperfusion (I/R) ist die globale Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens. Dabei ist vorrangig der infarzierte Teil des Herzens betroffen.

Das Infarktgebiet ist unter anderem gekennzeichnet durch einen Verlust von Kardiomyozyten⁶⁹. In der Folge kommt es im weiteren Verlauf der Infarktheilung zu Umbauprozessen des Gewebes, welche schließlich in einer Herzinsuffizienz resultieren können. Der zeitliche Ablauf dieser Umbauprozesse wird dabei in drei Phasen unterteilt: (1) Während der inflammatorischen Phase innerhalb der ersten 72 Stunden nach Reperfusion kommt es zur Infiltration des infarzierten Gewebes durch neutrophile Granulozyten und Monozyten. Es kommt zur Entfernung von toten Zellen und Bruchstücken der extrazellulären

Matrix. (2) Im Zuge der Proliferationsphase (72 h-7 d nach Reperfusion) wird der Großteil der toten Kardiomyozyten durch Granulationsgewebe, überwiegend bestehend aus Fibroblasten, Makrophagen und neu gebildeten Kapillaren, ersetzt. Die Fibroblasten differenzieren dabei zu Myofibroblasten und produzieren Proteine der extrazellulären Matrix. (3) In der Reifungsphase (7-21 d nach Reperfusion) kommt es zum apoptotischen Untergang von Fibroblasten, zur Regression von Mikrogefäßen und zur Bildung einer kollagenreichen Narbe^{72,73}.

Im Infarktgebiet überwiegt während der Ischämie die anaerobe Glykolyse. In der Folge kommt es zu einem Abfall des zellulären ATP-Gehalts und einer damit einhergehenden Dysfunktion von ATP-abhängigen Ionentransportprozessen. Dies trägt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und schließlich zur Überladung der Zelle mit Kalzium bei. Im Zuge dessen kommt es zur Aktivierung einer Reihe von Mechanismen, die zum Zelltod durch Apoptose und Nekrose nach I/R beitragen^{74,75}. Mechanismen, die hierbei zum Untergang von Kardiomyozyten führen, umfassen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies während der Reperfusionsphase,, die Öffnung des *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP)-Komplexes sowie die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien⁶⁹. Darüber hinaus kommt es durch die gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration zur kalziumabhängigen Aktivierung von Calpainen. Diese Cysteinproteasen spalten eine Vielzahl von Proteinen, darunter eine Reihe von Schlüsselproteinen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs, wie NCX, L-Typ Kalziumkanäle, RyR und SERCA2a^{76,77}. Bei kardialer Ischämie sowie nach I/R kommt es durch diesen und weitere Mechanismen zu einer Dysfunktion der Kalziumaufnahme ins SR, welche auf einer reduzierten Kalzium-ATPase-Aktivität beruht⁷⁸⁻⁸⁰. Die kausale Beteiligung einer gestörten kardiomyozytären Kalziumhomöostase an der kardialen Dysfunktion nach I/R wird durch verschiedene Studien belegt. Es konnte in verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass die Normalisierung der Kalziumaufnahme ins SR durch SERCA2a-Überexpression oder -Gentransfer nach I/R protektive Effekte besitzt⁸¹⁻⁸³. Umgekehrt zeigten Mäuse mit einer heterozygoten SERCA2a-Defizienz eine stärkere Gewebeschädigung nach I/R⁸⁴. Dies zeigt die zentrale Bedeutung eines intakten kardiomyozytären Kalziumkreislaufs für die Herzfunktion, insbesondere nach I/R, auf.

Neben dem Infarktgebiet zeigen auch die nicht-infarzierten Bereiche des Myokards, das sogenannte *remote* Myokard (RM), eine eingeschränkte Kontraktilität⁸⁵⁻⁸⁷. Somit trägt auch das *remote* Myokard wesentlich zur Abnahme der gesamten Herzleistung bei. Im Vergleich zum Infarktgebiet, sind die zugrunde liegenden Mechanismen hier jedoch weniger gut untersucht. Trotz dessen, dass die in den letzten Jahrzehnten entwickelten Therapieansätze zu einer drastischen Abnahme der Mortalität nach akutem MI geführt haben, liegt diese in Europa und den USA immer noch bei etwa 5-7 %⁸⁸. Hierbei ist die Mortalität insbesondere innerhalb der ersten 24 Stunden nach MI erhöht^{89,90}. Unklar ist, inwiefern im RM ähnliche

Mechanismen wie im Ischämiegebiet eine Rolle spielen. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Reperfusion zur Dysfunktion des RM führen, könnte neue Ansatzpunkte für die weitere Verbesserung der Therapie und der Prognose für die Patienten liefern. Da die kardiomyozytäre Kalziumhomöostase von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit insbesondere Mechanismen untersucht, die zu einer gestörten Kalziumhomöostase im RM nach I/R führen können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der PLN-vermittelten Regulation von SERCA2a und ihre Rolle in der Pathogenese humaner Herzerkrankungen besser zu verstehen. Dazu wurden mit Hilfe von Mausmodellen die folgenden Fragestellungen untersucht:

1.4.1 Welche Bedeutung haben PLN-Pentameren für die Regulation von SERCA2a?

In vitro Vorarbeiten in transfizierten HEK293-Zellen zur Rolle von PLN-Pentameren haben gezeigt, dass neben Monomeren auch Pentamere eine Zielstruktur der Proteinkinase A darstellen und präferentiell phosphoryliert werden⁹¹. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich Pentamere funktionell von Monomeren unterscheiden und ihre Funktion über eine rein passive Rolle in der Speicherung inaktiver Monomere hinausgehen könnte. Deshalb war es Ziel dieses Teils der Arbeit, in einem Mausmodell die funktionelle Bedeutung von PLN-Pentameren bezüglich der Regulation der SERCA2a-Aktivität näher zu untersuchen.

1.4.2 Ist die Pentamerbildung von PLN an der Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie beteiligt?

Die PLN-Mutation R9C führt zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie in Menschen. Es konnte gezeigt werden, dass die R9C-Mutation zu einer verstärkten Protein-Protein-Interaktion mit PKA führt. Dabei wurde PKA verstärkt durch Pentamere bestehend aus Wildtyp-PLN und PLN-R9C gebunden. Es wird vermutet, dass dies die Grundlage für die verminderte Phosphorylierung von SERCA2a-inhibitorischen Wildtyp-PLN-Monomeren und die damit einhergehende verstärkte SERCA2a-Inhibition darstellt⁶⁵. Ob die Pentamerbildung für diesen dominanten Phosphorylierungsdefekt nötig ist oder ob auch PLN-R9C-Monomere diesen Effekt ausüben, ist bisher unklar. Ziel war es, den Pathomechanismus hinsichtlich des Phosphorylierungszustands von PLN-R9C und Wildtyp-PLN in Abhängigkeit der Pentamerbildung näher zu untersuchen

1.4.3 Kommt es im *remote* Myokard zu Veränderungen an kalziumregulierenden Proteinen?

Neben dem infarzierten Teil des Herzens trägt auch der nicht-infarzierte Teil, das sogenannte *remote* Myokard (RM), wesentlich zur Einschränkung der kardialen Pumpfunktion nach

Myokardinfarkt bei. Im Gegensatz zum infarzierten Teil sind die Mechanismen im RM hierbei unzureichend untersucht und weitgehend unverstanden. Im infarzierten Teil kommt es zu Veränderungen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs, welche kausal an der kardialen Dysfunktion nach MI beteiligt sind⁸¹⁻⁸⁴. Aus diesem Grund wurde die Hypothese überprüft, dass Veränderungen der kardiomyozytären Kalziumhomöostase auch im RM zur Funktionseinschränkung führen. Zielsetzung dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung der Proteinexpression und Regulation von Schlüsselproteinen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs als mögliche Ursache für die Dysfunktion des RM nach I/R.

2 Material und Methoden

2.1 Erzeugung und Haltung transgener Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt, (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die monomere PLN-Mutante wurde erzeugt, indem die Mutationen C36A, C41F und C46A in *Pln* Maus-cDNA eingeführt wurden. Wildtyp-*Pln* und *Pln*-AFA wurden unter Kontrolle des *Myh6*-Promotors kloniert. Die cDNA-Konstrukte wurden in Pronuklei befruchteter FVB/N Oozyten injiziert. Gründermäuse, deren Transgenexpression mit der physiologischen PLN-Expression vergleichbar war, wurden mit PLN-defizienten Mäusen (PLN-KO) gekreuzt, um eine homozygote Deletion des endogenen *Pln*-Gens zu erreichen. Analog wurden die Mauslinien TgF-PLN, TgF-AFA, TgF-R9C und TgF-AFA-R9C erzeugt. Diese Mauslinien exprimierten eine N-terminal FLAG-markierte PLN-Mutante. Für TgF-R9C wurde die Mutation R9C eingeführt. In der Mauslinie TgF-AFA-R9C besaß PLN die Mutationen R9C, C36A, C41F und C46A. Die Mauslinien TgF-R9C und TgF-AFA-R9C wurden nicht mit PLN-defizienten Mäusen gekreuzt, sodass diese Mauslinien das endogene *Pln*-Gen besaßen. Alle hier genannten Mauslinien wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einer spezifisch-pathogenfreien Umgebung gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte im Einklang mit den Vorgaben des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV).

2.2 Organentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte per zervikaler Disklokation zwischen 14:00 und 18:00 Uhr. Für einige Versuche wurden die Mäuse vorher für 20 Minuten mit Pentobarbital (50 µg/g Körpergewicht, intraperitoneal) narkotisiert und anschließend getötet. Während der Narkose wurde eine Auskühlung der Mäuse mittels einer Heizplatte (37 °C) verhindert. Die Stimulation mit Isoproterenol (5 µg, intraperitoneal) erfolgte während der Narkose. Die Herzentnahme der mit Isoproterenol behandelten Tiere erfolgte drei Minuten nach der Applikation. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da sich in Vorversuchen nach dieser Zeit ein Einfluss auf die Herzfrequenz zeigte. Die gesteigerte Herzfrequenz zeigt, dass die intraperitoneal verabreichte Substanz innerhalb dieser Zeitspanne das Herz erreichen konnte. Zur Entnahme der Herzen wurde der Thorax eröffnet und das Herz von umliegendem Gewebe freipräpariert. Überschüssiges Blut wurde entfernt, indem die so entnommenen, noch kontrahierenden Herzen in physiologische Kochsalzlösung überführt wurden. In dieser Lösung wurden die Herzen entsprechend weiter präpariert. Für die *western blot*-Analysen wurden die Vorhöfe verworfen und ausschließlich die Herzventrikel verwendet. Für die Analysen des

remote Myokards und der infarzierten Herzspitzen wurden die Vorhöfe entfernt und die beiden Gewebeteile voneinander getrennt und separat eingefroren. Als Kontrolle dienten die entsprechenden Gewebeteile von scheinoperierten Mäusen. Anschließend wurden die entsprechenden Gewebeteile in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des Gewebes bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alle tierexperimentellen Versuche wurden antragsgemäß vorab durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (Az. 84-02.04.2013.A122).

2.3 Proteinextraktion aus Herzgewebe

Die tiefgefrorenen Herzventrikel wurden in 800 μL modifiziertem RIPA-Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 mM EGTA, 0,5 % Triton™ X-100 (v/v), 0,1 % Desoxycholsäure (w/v), 0,1 % SDS (w/v), 140 mM NaCl) in Anwesenheit von Protease- und Phosphataseinhibitoren (2 mM Imidazol, 5 mM NaF, 4 mM K/Na-Tartrat, 100 μM PMSF, 10 mM Benzamidin) 3×10 s auf Eis mechanisch zerkleinert (Ultra-Turrax®, Ika® T10 basic, Dispergierwerkzeug S 10 N-5 G) und das entstandene Homogenat 15 min abzentrifugiert ($10000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). 600 μL des Überstandes wurden mit 300 μL eines modifizierten 3X Lämmli-Ladepuffers (6 % SDS (w/v), 30 % Glycerol (v/v), 0,015 % Bromphenolblau (w/v), 19,5 mM Tris, pH 6,8) versetzt und Aliquots hiervon in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein Teil des Überstandes 1 : 10 mit ddH₂O verdünnt. Die Modifikation des Lyse- und des Lämmli-puffers war notwendig, um die Kompatibilität mit den Phos-Tag™-Analysen entsprechend der Herstellerangaben zu gewährleisten. Da sich keine Auswirkung dieser Pufferlösungen auf die herkömmliche SDS-PAGE zeigte, wurden alle Proteinextraktionen mit diesen Pufferlösungen durchgeführt. Die Proteinextraktion aus *remote* Myokard bzw. den Herzspitzen wurde auf Grund der geringeren Menge an Gewebe in 600 μL Lysepuffer durchgeführt.

2.4 Präparation von Membranfraktionen aus Herzgewebe

Die Präparation von Membranfraktionen aus Herzgewebe erfolgte mittels differentieller Zentrifugation. Hierzu wurde das Herzgewebe zunächst mechanisch für 3×30 s in Präparationspuffer (300 mM Saccharose, 1 mM PMSF, 20 mM PIPES, 10 mM EDTA, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) mittels Ultra-Turrax® auf Eis zerkleinert. Unlösliche Bestandteile des entstandenen Homogenats wurden durch Zentrifugation entfernt (10 min, $8000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde anschließend für 30 min bei $100000 \times g$ zentrifugiert. Das entstandene Membranpellet wurde mittels Pressen durch eine 27 G-Kanüle in *storage*-Puffer (400 mM Saccharose, 5 mM HEPES, 5 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,2) resuspendiert. Das erhaltene Homogenat wurde mit modifiziertem 3X-Lämmli versetzt. Ein Teil des Homogenats wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration 1 : 10 verdünnt.

2.5 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen der 1 : 10 mit Wasser verdünnten Proben wurde mittels BCA-Methode gemessen (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Katalognr: 23225). Dabei bilden Proteine im alkalischen Milieu in der Anwesenheit von Na-K-Tartrat einen Chelatkomplex mit Cu^{2+} -Ionen aus. In der Folge kommt es zu einer Reduktion der Kupferionen zu Cu^{1+} . In einer darauf folgenden Reaktion bilden zwei Moleküle Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) mit einem Cu^{1+} -Ion einen intensiv violett gefärbten, wasserlöslichen Chelatkomplex. Die Absorption dieses Komplexes bei 562 nm verhält sich über einen weiten Bereich linear zur Proteinkonzentration, sodass diese fotometrisch anhand einer Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden kann. Die Herstellung der Standardreihe erfolgte mit bovinem Serumalbumin (BSA). Die fotometrische Messung wurde im 96-well-Format mittels Mikroplattenlesegerät (Synergy™ MX microplate reader, BioTek®) bei einer Wellenlänge von 562 nm vorgenommen. Aus den so gemessenen Konzentrationen wurden anschließend die Proteinkonzentrationen der unverdünnten und mit Lämmplipuffer versetzten Proben berechnet.

2.6 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die verwendeten HEK293-Zellen wurden von der Firma ATCC® bezogen und befanden sich zum Zeitpunkt der Inkulturnahme für die Experimente in Passage 3. Zellen für Experimente wurden maximal bis zur Passage 15 verwendet. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, 10 % FCS, PenStrep) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO_2 in T175-Zellkulturflaschen kultiviert. Vor jeder Teilung der Kulturen wurden diese auf Kontamination und Konfluenz überprüft. Die Kulturen wurden dreimal wöchentlich bei einer Konfluenz von ca. 90 % geteilt. Hierzu wurden zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS). Die Zellen wurden mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in frisches DMEM überführt und in einer frischen Zellkulturflasche 1 : 7 verdünnt.

2.7 Transfektion von HEK293-Zellen mittels Kalziumphosphat-Methode

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mittels Kalziumphosphat-Methode nach⁹². Die Zellen wurden etwa 6 Stunden vor der Transfektion auf 100 mm Zellkulturschalen ausplattiert. Dazu wurden die Zellen einer zu 90 % konfluenten T175 Zellkulturflasche 1 : 14 auf 100 mm Zellkulturschalen ausplattiert. In einem sterilen 15 mL Reaktionsgefäß wurden zu 450 μL sterilem ddH_2O 10 μg des entsprechenden Plasmids gegeben und mit 50 μL CaCl_2 -Lösung (2,5 M) versetzt. Anschließend wurden 500 μL 2X BBS-Lösung (280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 50 mM BES, pH 6,95 bei 20 °C, steril filtriert) zugegeben, die Ansätze 15 mal kräftig geschüttelt und für 15 min ruhen gelassen. Von diesem Ansatz wurden 950 μL gleichmäßig verteilt ins Medium der Zellkulturplatten getropft. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

2.8 Proteinextraktion aus HEK293-Zellen

Die Zellen wurden nach Entfernung des Mediums mit eiskalter DPBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL DPBS (+ Protease- und Phosphataseinhibitoren) mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Zellen erfolgte per Ultraschall für 10 s. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurde das entstandene Zellhomogenat für 15 min bei 10000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Ko-Immunopräzipitationsversuche eingesetzt oder für *western-blot*-Analysen direkt mit Lämmli-Ladepuffer versetzt. Ein Teil des Überstandes wurde für die Messung der Proteinkonzentration 1 : 5 mit ddH₂O verdünnt.

2.9 Detektion von Proteinen mittels Immunoblot (*western blot*)

Die Proteine wurden auf einem 15 %igen bzw. 6 %igen (RyR2) Polyacrylamidgel entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt. Im Anschluss an die Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen (100 V konstant, 1 h). Die Membran wurde mit dem entsprechenden Erstantikörper in 5 % Milchpulver in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween® 20, pH 7.6) bei 4 °C schwenkend über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran viermalig mit 30 mL TBS-T gewaschen, 10 min mit dem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert und abschließend nochmals mit 4×30 mL TBS-T gewaschen (SNAP i. d. 2.0, Millipore). Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte mittels ECL-Reagenz (Luminata forte, Millipore) und Röntgenfilm (Super RX-N, Fujifilm). Die Röntgenfilme wurden für verschiedene Zeitintervalle belichtet und anschließend mit einem Durchlichtscanner digitalisiert (ScanMaker i800plus, Microtek). Die semiquantitative Analyse der Signalstärken ungesättigter Signale erfolgte mittels der Software Image Studio Lite 4.0 (Licor).

2.10 Immunopräzipitation von PLN aus transfizierten HEK293-Zellen

Für die Ko-Immunopräzipitationsversuche wurden HEK293-Zellen mit N-terminal FLAG-markiertem PLN bzw. PLN-AFA oder PLN-R9C transfiziert. Protein G-beschichtete Dynabeads® (LifeTechnologies) wurden 10 Minuten lang mit anti-FLAG-Antikörper in 0,02 % Tween® 20 in PBS (PBS-T) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS und drei Waschschritten mit Triethanolamin (200 mM, pH 8,2) wurden Antikörper und Dynabeads® mit 20 mM Dimethylpimelimidate in 200 mM Triethanolamin (pH 8,2) für 30 Minuten kovalent quervernetzt. Die Quervernetzungsreaktion wurde nach Abnehmen des Überstandes durch Zugabe von 50 mM Tris (pH 7,5) gestoppt. Anschließend wurden die Dynabeads® zweimalig mit 0,1 % BSA (w/v) in PBS, dreimalig mit Zitratpuffer (100 mM Zitrat, pH 2,5) und abschließend erneut zweimalig mit 0,1 % BSA (w/v) in PBS gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die Zugabe der Zelllysate. Dabei wurden 800 µg Protein in einem Volumen von 750 µL eingesetzt. Da die Proteinextraktion aus den Zellen in PBS mit

Protease- und Phosphataseinhibitoren erfolgte, wurde dieser Puffer für die Verdünnung der Zelllysate auf die entsprechende Konzentration verwendet. Nach einer 15-minütigen Inkubation unter Rotation wurde der Überstand abgenommen und der Antigen-Antikörper-Dynabeads®-Komplex dreimalig mit 200 µL PBS-T gewaschen. Zur Vermeidung der Elution von unspezifisch an die Wand des Reaktionsgefäßes gebundenen Proteinen wurde der so gewaschene Antigen-Antikörper-Dynabeads®-Komplex in 100 µL PBS-T resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde abgenommen und die Elution erfolgte unter Schwenken (350 rpm) in 40 µL 1X Lämmli-Puffer bei 40 °C für 10 min. Abschließend wurde das Eluat von den Dynabeads® abgenommen und für die *western blots* eingesetzt.

2.11 Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN mittels Phos-Tag™

Die Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN wurde mittels Phos-Tag™ SDS-PAGE durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine gelelektrophoretische Methode, mit welcher Proteine sowohl nach Molekulargewicht als auch nach Anzahl der Phosphorylierungen aufgetrennt werden können. Herzgewebe-Lysate wurden auf 12,5 %igen Polyacrylamidgelen mit Zusatz von 17,5 µM Phos-Tag™-Acrylamid (AAL-107, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) und 35 µM MnCl₂ aufgetrennt. Vor der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde das Mangan durch 10-minütige Inkubation mit 10 mM EDTA in Blottingpuffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v)) aus den Gelen entfernt. Anschließend wurden die Gele für 6 min in Blottingpuffer ohne EDTA gewaschen und die Proteine wie oben beschrieben auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von PLN bzw. N-terminal FLAG-markiertem PLN erfolgte mittels anti-PLN- bzw. anti-FLAG-Antikörper.

2.12 Herstellung kompetenter Bakterien

5 mL LB-Medium wurden mit *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 mL LB-Medium in einen sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben steril abgefüllt und mit 1 mL der Vorkultur beimpft. Die Kultur wurde für 3-4 Stunden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 660 nm geschwenkt. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL kaltem Transformationspuffer (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7 mit KOH eingestellt, steril filtriert) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 19 mL Transformationspuffer erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 4000 rpm für 10 Minuten wurde das Zellpellet in 3,5 mL Transformationspuffer und 280 µL DMSO resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde zu 200 µL in sterilen Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur Transformation der Bakterien bei -80 °C gelagert.

2.13 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurde jeweils ein Aliquot der kompetenten Bakterien verwendet. Das Aliquot wurde auf Eis aufgetaut. Eine sterile Pipettenspitze wurde in die Stocklösung ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) des zu transformierenden Vektors eingetaucht, ohne mit der Pipette ein Volumen aufzunehmen. Diese Spitze wurde anschließend kurz in die Zellsuspension der kompetenten Bakterien eingetaucht. Nach drei Minuten auf Eis wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 s bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, 1 mL LB-Medium zugegeben und für weitere 45 Minuten bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend abzentrifugiert, das Zellpellet in $50\text{ }\mu\text{L}$ LB-Medium resuspendiert und auf Ampicillin-haltigen Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

2.14 DNA-Aufreinigung aus transformierten Bakterien

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mittels NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Eine Kolonie der transformierten Bakterien wurde zur Beimpfung einer 200 mL Kultur in Ampicillin-haltigem LB-Medium verwendet. Diese wurde über Nacht schwenkend bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Kultur wurde bei 4500 rpm bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet in 8 mL Resuspensionspuffer (mit RNase A) resuspendiert. Die DNA-bindenden Säulen wurden mit 12 mL Äquilibriumspuffer äquilibriert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 8 mL Lysepuffer und 5-maligem invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurde der Ansatz durch Zugabe von 8 mL Neutralisationspuffer neutralisiert und die Säulen mit dem aufgeschwenkten Lysat beladen. Nach Durchlauf des Lysats wurde der Filter mit 5 mL Äquilibriumspuffer gewaschen. Der Filter wurde entfernt, die Säulen mit 8 mL Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 5 mL Elutionspuffer eluiert. Nach Zugabe von 3,5 mL wurde das Eluat für 30 Minuten bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 4500 rpm abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Zum DNA-Pellet wurden 2 mL 70 %iger Ethanol gegeben und erneut für 5 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Ethanols wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in $100\text{ }\mu\text{L}$ sterilem Millipore- H_2O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde abschließend auf $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt. Die so aufgereinigte DNA wurde für die Transfektion von HEK293-Zellen verwendet.

2.15 Plasmide und DNA-Konstrukte

Die verschiedenen DNA-Konstrukte wurden zur Verfügung gestellt und lagen im Vektor pcDNA3 (Invitrogen) vor (Abbildung 6). In diesen und wurden sie mittels BamHI und EcoRI kloniert. PLN-cDNA wurde mittels PCR aus Mausherz-cDNA amplifiziert. Hierzu wurden spezifische flankierende Primer verwendet, welche zusätzlich die BamHI- und EcoRI-Erkennungssequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende besaßen. Die Erzeugung von PLN-AFA erfolgte mittels *nested* PCR. Dabei wurden an den Positionen 36, 41 und 46 die Mutationen

C36A, C41F und C46A eingeführt. PLN-R9C wurde mit derselben Methode durch Einbringung der Mutation R9C erzeugt. PLN-AFA-R9C besaß die Mutationen R9C, C36A, C41F und C46A. Bei dieser Methode zur Erzeugung von spezifischen Mutationen in einer DNA-Sequenz werden mehrere aufeinanderfolgende PCR-Schritte durchgeführt. In einem ersten Schritt werden zwei PCR-Reaktionen mit Primerpaaren durchgeführt, von denen jeweils ein Primer die gewünschte Mutation enthält und inmitten der Sequenz bindet. Der zweite Primer flankiert die Ausgangssequenz und besitzt zusätzlich die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme, die für die Klonierung verwendet werden sollen. Folgende Primersequenzen wurden dabei verwendet:

PLN-BamF: GACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATG

FLAG-BamF: CTGTTAGGATCCATGGATTATAAAGACGACGACGATAAAGAGAAA

PLN-EcoR1R: CTGTCAAGGAATTCAGTCAGAGAAGCATGACGATG

AFA-PLNF: GCTCTCATCTTGATATTTCTCCTGCTGATCGCCATC

AFA-PLNR: GCGATCAGCAGGAGAAATATCAAGATGAGAGCGAAA

R9C-PLNF: AATACCTCACTTGCTCTGCTATAAGAAGGGCCTC

R9C-PLNR: TTATAGCAGAGCAAGTGAGGTATTGAACTTTCTC

Dabei bezeichnen AFA-PLNF bzw. AFA-PLNR und R9C-PLNF bzw. R9C-PLNR die Primer, welche die einzubringenden Mutationen in ihrer Sequenz enthielten. Die beiden PCR-Reaktionen des initialen Mutageneseschritts wurden mit den Primern PLN-BamF/AFA-PLNR und AFA-PLNF/PLN-RcoR1R (bzw. für PLN-R9C: PLN-BamF/R9C-PLNR und R9C-PLNF/PLN-EcoR1R) durchgeführt (30 Zyklen, 55 °C *annealing*). Anschließend wurden die PCR-Produkte gemischt und mit den Primern PLN-BamF/PLN-EcoR1R der komplette *open reading frame* (ORF) mit den enthaltenen

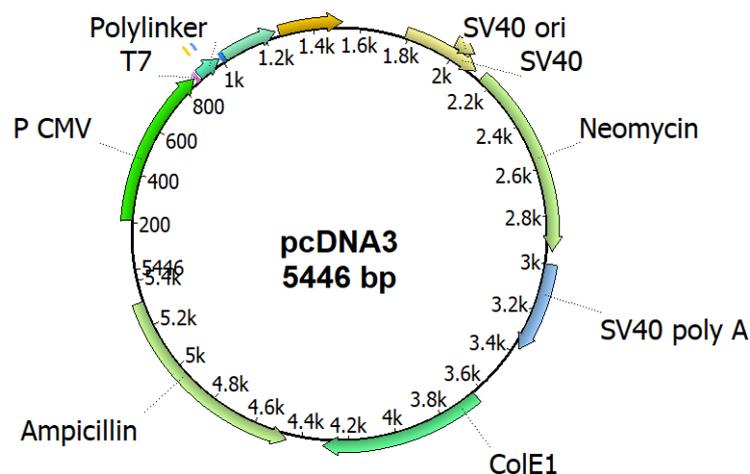


Abbildung 6 Vektorkarte von pcDNA3 (modifiziert nach Angaben der Firma Invitrogen). Die Polylinkerregion enthält folgende Erkennungssequenzen (von 5' nach 3'): HindIII, KpnI, BamHI, BstXI, EcoRI, EcoRV, BstXI, NotI, XhoI, XbaI und ApaI. P CMV: CMV-Promotor (bp 209-863), T7: T7-Promotor (bp 864-882), SV40: SV40-Promotor (bp 1790-2115), SV40 polyA (bp 3000-3372), Neomycin: Neomycin ORF (bp 2151-2945), ColE1: ColE1-origin (bp 3632-4305), Ampicillin: Ampicillin ORF (bp 4450-5310).

Mutationen amplifiziert (30 Zyklen bei initial 50 °C, dann 57 °C *annealing*). Das PCR-Produkt dieser Reaktion wurden mittels BamHI und EcoRI in den Vektor pcDNA3 kloniert. Zur Erzeugung der Sequenzen für die N-terminal FLAG-markierten PLN-Konstrukte wurden die Primer FLAG-BamF/PLN-EcoR1R verwendet. Für die Klonierung der SERCA2a-Sequenz aus Mausherz-cDNA wurden folgende Primer verwendet:

SERCA2aF: AAGAAAAGGAGGGGACAGC

SERCA2aR: GGCAAGGAGTTGTCCTCATC

2.16 Messung der PP1- und PP2A-Aktivität

Die Messung der Aktivität von PP1 und PP2A erfolgte mittels ³²P-Phosphorylase a als Substrat. Die Aktivität von PP2A wurde als Anteil der Gesamtaktivität bestimmt, welcher durch 3 nM Okadasäure inhibiert wurde. In dieser Konzentration stellt Okadasäure einen spezifischen PP2A-Inhibitor dar. Unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Gewebe (10 mg) wurden in 4 mM EDTA und 15 mM β-Mercaptoethanol (pH 7,4) mittels Ultraschall weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde für 20 Minuten bei 14000×g abzentrifugiert und der Überstand für die Messungen eingesetzt. Der Inkubationsansatz für die Messungen enthielt neben dem Substrat 20 mM Tris (pH 7,0), 5 mM Koffein, 0,1 mM EDTA und 0,1 % β-Mercaptoethanol (v/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Überstände gestartet und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 %iger Trichloressigsäure gestoppt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Die Radioaktivität in den so erhaltenen Überständen wurde gemessen und auf die eingesetzte Proteinmenge und die Inkubationsdauer bezogen.

2.17 Isolation von Kardiomyozyten aus Mausherzen und Messung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs

Die Kardiomyozytenisolation und die Messungen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs wurden von Annette Kronenbitter, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt. Zur Isolation von Kardiomyozyten wurden Mausherzen zunächst mit 50 mL Puffer II und anschließend 6 min bei 37 °C retrograd mit einer Kollagenase I-Lösung (Worthington Biochemical Corp.) perfundiert. Das Herz wurde in eine Petrischale mit Waschpuffer I überführt, die Aorta entfernt und das Herz in drei Teil bis zur Herzspitze eingeschnitten. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C des so präparierten Herzens. Anschließend wurde das Gewebe mit einer feinen Schere zerkleinert und mittels Pasteurpipette dissoziiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz mit 150 µm Porengröße in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Kardiomyozyten wurden 5-10 min sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in Waschpuffer II resuspendiert und die Zellen erneut 5-10 min sedimentiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet in Waschpuffer III resuspendiert. Nach 20-minütiger

Sedimentation und kurzem Abzentrifugieren bei 450 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in *loading buffer* resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 1 mL aliquotiert und mit je 1 μ L Fura2 (1 μ g in DMSO) versetzt. Die so mit Fura2 beladenen Kardiomyozyten wurden anschließend zweimal mit *loading buffer* gewaschen und abschließend in Perfusionspuffer aufgenommen. Die Messung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs erfolgte bei Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm mittels HyperSwitch Myocyte System (IonOptix Corp.). Die verwendeten Puffer besaßen folgende Zusammensetzung (in mM):

Puffer I: 126 NaCl, 4,4 KCl, 1 MgCl₂

Puffer II: 4 NaHCO₃, 10 HEPES, 30 BDM, 11 Glukose, 50 mL Puffer I, ad 1000 mL, pH 7,3-7,35

Puffer III: 4 NaHCO₃, 10 HEPES, 11 Glukose, 50 mL Puffer I, ad 1000 mL, pH 7,3-7,35

Waschpuffer I: 2 % BSA (w/v), 0,1 CaCl₂ in Puffer II

Waschpuffer II: 2 % BSA (w/v), 0,2 CaCl₂ in Puffer II

Waschpuffer III: 2 % BSA (w/v), 0,5 CaCl₂ in Puffer II und Puffer III (Puffer II und III im Verhältnis 1 : 1)

2.18 Induktion von Ischämie/Reperfusion

Zur Induktion von Ischämie und darauf folgender Reperfusion wurde ein *closed-chest*-Modell verwendet⁹³. Die chirurgischen Eingriffe wurden von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt. Die Auslösung der Ischämie/Reperfusion erfolgte durch Annette Kronenbitter (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf). 10-12 Wochen alte, männliche Mäuse des Mausstamms C57BL/6J wurden durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Die narkotisierten Mäuse wurden intubiert und mit einem Ventilationsgerät verbunden (Minivent Microventilator, Hugo Sachs). Mittels Heizplatte wurde die Körpertemperatur bei 37 °C gehalten. Nach Eröffnung des Thorax und Entfernung des Perikards wurde der *Ramus interventricularis anterior* (engl. *left anterior descending*, LAD) identifiziert und mit einem 0-7 Prolenfaden unterstochn. Die Enden des Fadens wurden beim Verschließen des Thorax in einer subkutanen Tasche platziert. Anschließend wurde zur postoperativen Analgesie Buprenorphin injiziert (0,05-0,1 mg/kg, subkutan, alle 8 Stunden). Drei Tage nach der initialen Operation wurden die Mäuse durch inhalative Gabe von Isofluran (2,0 Vol%) narkotisiert. Die Enden des Fadens wurden freigelegt und vorsichtig zugezogen, sodass eine Okklusion der LAD resultierte. Die myokardiale Ischämie wurde durch kontinuierliche Überwachung der ST-Strecken-Hebung mittels EKG bestätigt. Nach 60-minütiger Okklusion der LAD wurde der Faden gelockert und die Reperfusion mittels EKG verifiziert. Nach Wundverschluss erhielten die Mäuse erneut Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg,

subkutan, alle 8 Stunden). Die Kontrollgruppe durchlief dieselbe chirurgische Prozedur ohne Okklusion der LAD. Die Entnahme der Herzen erfolgte 24 Stunden nach der einstündigen Ischämie. Die hier aufgeführten tierexperimentellen Arbeiten wurden antragsgemäß vorab durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter der Antragsnummer Az. 84-02.04.2013.A122 genehmigt.

2.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 7.03 Software (GraphPad Software Inc.). Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem Student's *t*-Test verglichen. Die statistische Auswertung der mittels Phos-Tag™ erhaltenen Daten wurde mittels multipler *t*-Tests durchgeführt und die *p*-Werte anschließend nach der Holm-Sidak-Methode für multiples Testen korrigiert. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.20 Verwendete Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
RyR2 clone 34C	1:5000	Thermo Fisher Scientific
pRyR2(S2814)	1:5000	Badrilla
pRyR2(S2808)	1:5000	Badrilla
SERCA2a clone Y/1F4	1:5000	Badrilla
PLN clone A1	1:5000	Badrilla
phospho-PLN (S16)	1:5000	Badrilla
phospho-PLN (T17)	1:5000	Badrilla
HAX-1 clone 52/HAX-1	1:5000	BD Transduction Laboratories™
S100A1	1:5000	Acris
Cardiac Tnl	1:2000	Cell Signaling Technology®
phospho-Tnl (S23/24)	1:2000	Cell Signaling Technology®
FLAG clone M2	1:10000	Sigma
PKA cat α	1:1000	Cell Signaling Technology®
PP1 γ	1:5000	Millipore
Goat-anti-rabbit IgG (H+L) <i>hrp</i> -gekoppelt	1:10000	Rockland
Goat-anti-mouse IgG (H+L) <i>hrp</i> -gekoppelt	1:10000	Rockland

2.21 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	
SNAP i.d. [®] 2.0 Mini Blot Holders (7.5 x 8.4 cm)	Merck Millipore Ltd.
Luminata Forte Western HRP-Substrat	Merck Millipore Ltd.
Immobilon [®] -P PVDF-Membran	Merck Millipore Ltd.
Fuji Super RX-N	Fujifilm Europe GmbH
Carestream [®] Kodak [®] autoradiography GBX developer/replenisher	Kodak [®]
Carestream [®] Kodak [®] autoradiography GBX fixer/replenisher	Sigma-Aldrich [®]
Phos-Tag [™] -Acrylamid	Fujifilm Wako Chemicals Europe GmbH
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth [®]
TEMED	Sigma-Aldrich [®]
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich [®]
SDS ultra pure für die Gelelektrophorese	Carl Roth [®]
Benzamidin	Sigma-Aldrich [®]
PMSF	Sigma-Aldrich [®]

Tabelle 3: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gerätschaften.

Geräte	
SNAP i.d. [®] 2.0	Millipore
Microtek ScanMaker i800plus	Microtek
Milli-Q Biocel	Millipore
Mini-PROTEAN [®] II Electrophoresis Cell	BioRad
Mini Trans-Blot [®] Cell	BioRad
BioRad Gelgießstation	BioRad
Ultra-Turrax [®] , Ika [®] T10 basic, Dispergierwerkzeug S 10 N-5 G	Ika [®]
Dispergierwerkzeug S 10 N-5 G	Ika [®]

Tabelle 4: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Software.

Software	
GraphPad Prism 7.03	GraphPad
Inkscape	Inkscape
Image Studio Lite 4.0	Licor
Microsoft Office	Microsoft
UGene	UGene

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von PLN-Pentameren in der Regulation von SERCA2a

3.1.1 Molekulare Charakterisierung der Mauslinien TgPLN und TgAFA als Modell für rein monomeres Phospholamban

Zur Untersuchung der Funktion von PLN Pentameren wurde die transgene Mauslinie TgAFA verwendet. Diese exprimiert die PLN-Mutante PLN-AFA kardiomyozytenspezifisch unter der Kontrolle des *myh6*-Promotors (Abbildung 7). Wie in Abschnitt 1.2.5 beschrieben, werden bei der PLN-AFA-Mutante die drei Cysteinreste der Transmembranregion (C36, C41, C46) gegen Alanin, Phenylalanin und Alanin ausgetauscht (A36, F41, C46). Da diese drei Cysteine für die Pentamerbildung von Bedeutung sind, führt der Austausch dieser zur Destabilisierung von Pentameren, sodass deren Bildung vollständig verhindert wird. Endogenes Phospholamban fehlte der Mauslinie TgAFA vollständig (PLN-KO). Somit konnten PLN-Monomere in einem Mausmodell in der Abwesenheit von Pentameren untersucht werden. Zum Vergleich wurde die Mauslinie TgPLN verwendet. Analog zur Mauslinie TgAFA exprimiert diese Wildtyp-Phospholamban kardiomyozytenspezifisch unter der Kontrolle des *myh6*-Promotors. Endogenes Phospholamban fehlte dieser Linie ebenfalls. Der Unterschied zwischen beiden Mauslinien bestand somit in der An- bzw. Abwesenheit von PLN-Pentameren und der AFA-Mutation. Beide Mauslinien waren heterozygot für das Transgen. Zusätzlich dazu wurden PLN-defiziente (PLN-KO) Geschwistertiere aus beiden Mauslinien als Kontrolle in den Experimenten verwendet. Die Mauslinie PLN-KO wurde freundlicherweise von Prof. E. Kranias (Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati, USA) zur Verfügung gestellt⁹⁴. Vorarbeiten, durchgeführt von Prof. Dr. med Joachim Schmitt, zeigten keinen Einfluss der Transgenexpression auf Entwicklung und Lebensspanne der

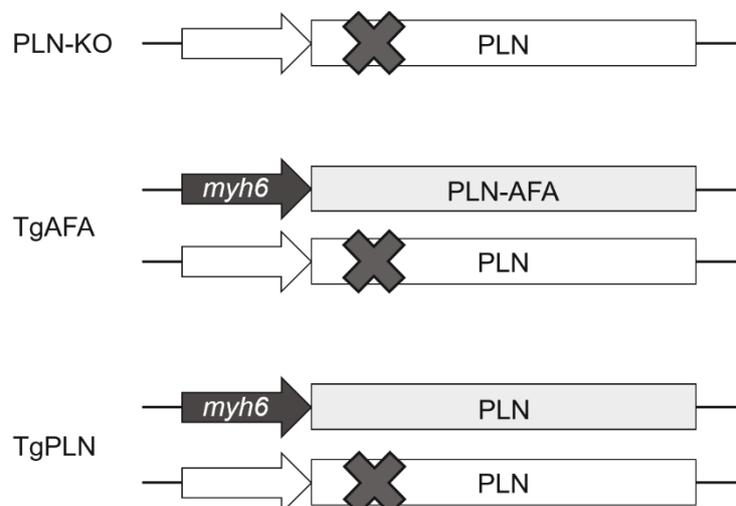


Abbildung 7 Schematische Darstellung des genetischen Hintergrunds der verwendeten Mauslinien PLN-KO, TgAFA und TgPLN. *myh6*: α -myosine heavy-chain Promotor

Mäuse. Die Herzen waren über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten makroskopisch und histologisch von altersgleichen Wildtyp-Herzen nicht zu unterscheiden.

Zur Bestätigung des reinen Monomercharakters von PLN-AFA wurden *western blot*-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die tiefgefrorenen Herzventrikel mechanisch homogenisiert. Nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurden die Überstände mit Ladepuffer versetzt und für die Analysen eingesetzt. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen analysiert. In ventrikulären Herzgewebe-Lysaten der Linie TgAFA wurden lediglich PLN-Monomere (~6 kDa), jedoch keine Pentamere (~25 kDa) detektiert (Abbildung 8 A, oben). Die Linie TgPLN zeigte Pentamere und Monomere in einem vergleichbaren Verhältnis wie Wildtyp-Mäuse. Zur weiteren Charakterisierung der beiden Mauslinien wurde die

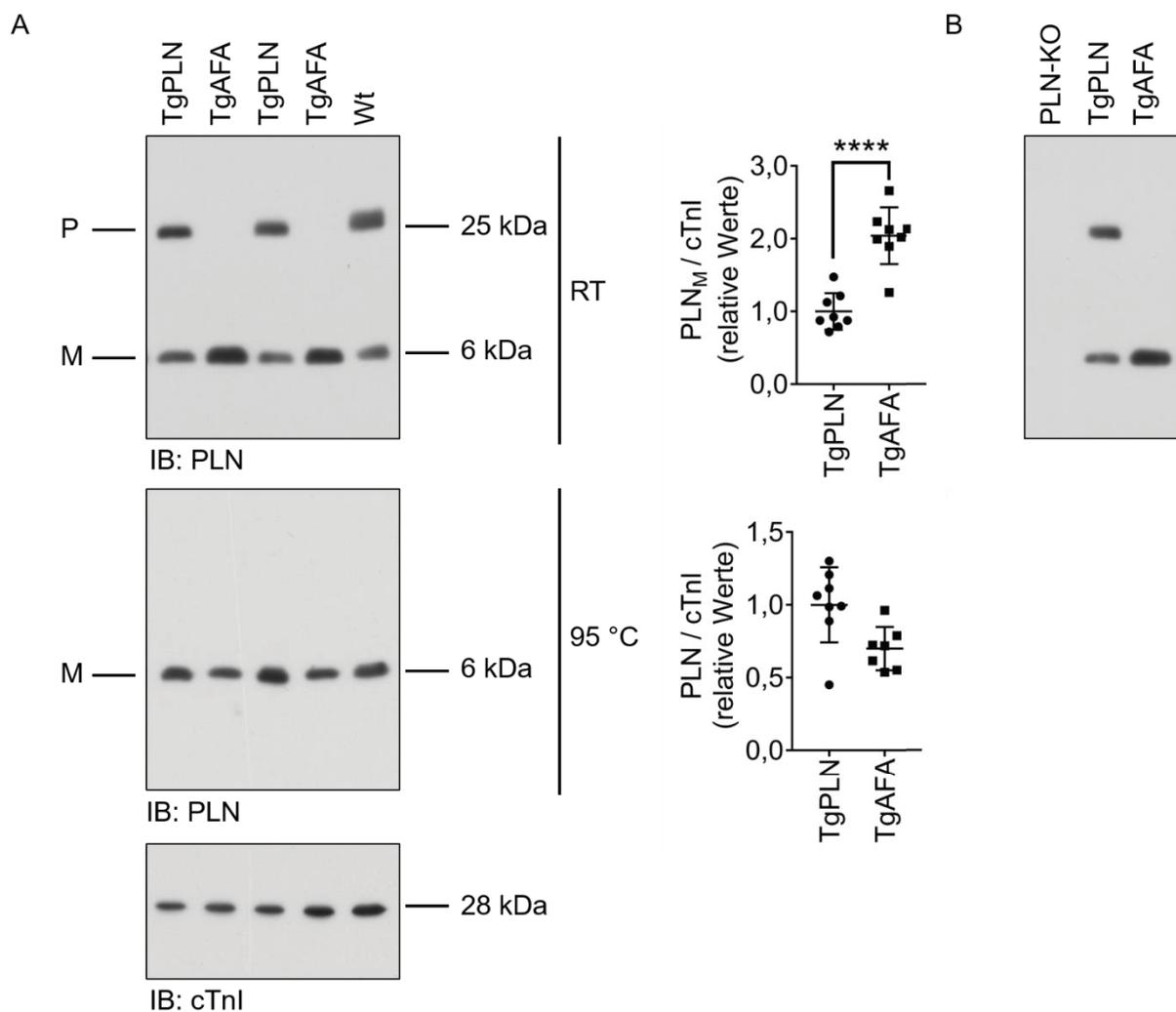


Abbildung 8 Vergleich der Transgenexpression in Herzventrikeln der Mauslinien TgPLN und TgAFA. (A) Die Menge von PLN-Monomeren war in der Mauslinie TgAFA durch die fehlende Pentamerbildung signifikant erhöht (oben). Zur besseren Vergleichbarkeit der Proteinexpression wurden die Pentamere durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C in Monomere zerlegt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression der Transgene zwischen den Mauslinien TgPLN und TgAFA (unten). (B) Der in der vorliegenden Arbeit verwendete anti-PLN-Antikörper ist spezifisch für PLN und zeigte kein Signal in PLN-defizienten Herzventrikel-Lysaten. PLN-KO: PLN-defiziente Mäuse, Wt: Wildtyp, PLN: Phospholamban, cTnI: kardiales Troponin I, P: Pentamer, M: Monomer, RT: Raumtemperatur, PLN_M: PLN-Monomere, IB: Immunoblot, Mittelwerte ± SD, n=8 Herzen pro Gruppe, ****P<0,0001, ungepaarter t-Test.

Proteinexpression der Transgene mittels *western blot*-Analyse quantifiziert. Die Proben wurden vor der Proteinexpressionsanalyse für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Da PLN-Pentamere nicht hitzestabil sind, führte dies zum Zerfall der Pentamere in Monomere. Dies ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit der PLN-Expression. Die Proteinexpression beider Transgene war nicht signifikant voneinander verschieden (Abbildung 8 A, unten). Auf Grund der fehlenden Pentamerbildung wies die Mauslinie TgAFA jedoch eine etwa zweifach größere Menge an Monomeren auf (Abbildung 8, oben, $P < 0,0001$). Die Expressionsstärke beider Transgene war vergleichbar mit der PLN-Proteinexpression von Wildtyp-Mäusen. Somit lagen annähernd physiologische Proteindosen vor, sodass Artefakte durch eine unphysiologisch hohe Überexpression unwahrscheinlich sind. Zur Kontrolle der Spezifität des in dieser Arbeit verwendeten anti-PLN-Antikörpers wurden Herzventrikel-Lysate der PLN-defizienten Mauslinie PLN-KO verwendet. Mit diesem Antikörper zeigte sich keinerlei Signal in Herzgewebe-Lysaten aus PLN-KO-Mäusen (Abbildung 8 B).

3.1.2 Der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf in isolierten Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren

Die funktionellen Messungen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs an isolierten Kardiomyozyten sowie die Datenauswertung dieser Messungen wurden von Annette Kronenbitter, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Zellen aus TgPLN zeigten im Vergleich mit PLN-KO-Zellen eine verlangsamte Kalziumelimination aus dem Zytosol (Abbildung 9, $P < 0,01$). Im Gegensatz dazu war die Kalziumelimination in TgAFA- im Vergleich mit PLN-KO Kardiomyozyten nur tendenziell, jedoch nicht signifikant langsamer. Die zytosolische Kalziumelimination verlief in TgAFA-Kardiomyozyten signifikant schneller als in TgPLN ($P < 0,05$, TgAFA vs. TgPLN). Die Stimulation mit Isoproterenol beschleunigte die Kalziumelimination in TgPLN- stärker als in TgAFA-Kardiomyozyten. Die Geschwindigkeit der Kalziumelimination war nach Stimulation in beiden Linien nicht mehr signifikant voneinander verschieden. Kardiomyozyten aus PLN-KO reagierten nicht mit einer Steigerung der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination auf die Isoproterenol-Stimulation.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass PLN die SERCA2a unter basalen Bedingungen stärker als PLN-AFA inhibiert. Durch β -adrenerge Stimulation konnte der inhibitorische Effekt in beiden Mauslinien nahezu vollständig aufgehoben werden. Da der SERCA2a-inhibitorische Effekt von PLN-Monomeren überwiegend durch die PKA-abhängige Phosphorylierung an S16 reguliert wird, deutete dies auf einen unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus von PLN-Monomeren in den beiden Mauslinien hin. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Phosphorylierung von Pentameren sowie Monomeren in ventrikulärem Herzgewebe dieser Mauslinien untersucht.

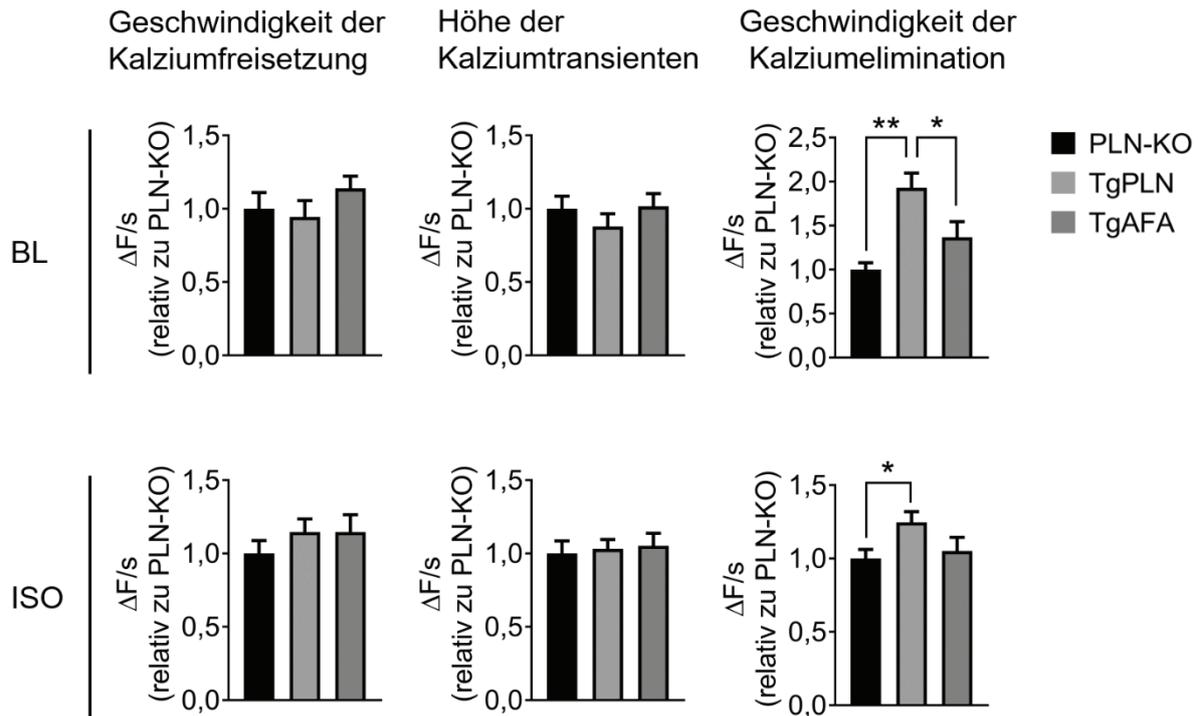


Abbildung 9 Untersuchung des Einflusses von PLN-Pentameren auf die zytosolische Kalziumelimination. Messungen von Kalziumtransienten (Fura-2-Methode) in aus Herzen der Mauslinien PLN-KO, TgPLN und TgAFA isolierten Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen (BL), sowie nach Stimulation mit 100 nM Isoproterenol (ISO); n=10 Mäuse pro Gruppe (10 Zellen pro Maus); Mittelwert \pm SEM; Messungen und Datenauswertung durchgeführt von Annette Kronenbitter, Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

3.1.3 Basaler Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren und -Pentameren an den Phosphorylierungsstellen S16 und T17

Zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von PLN-Monomeren und Pentameren wurden *western blot*-Analysen von Herzventrikel-Lysaten der Mauslinie TgPLN durchgeführt. Hierbei wurden Monomere und Pentamere gelelektrophoretisch voneinander getrennt und deren Phosphorylierung mittels phospho-S16-spezifischer Antikörper quantifiziert. In denselben Proben wurden parallel dazu die Gesamtmengen von PLN-Monomeren und -Pentameren mit Hilfe von anti-PLN-Antikörpern, die PLN unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand detektieren, bestimmt und die Phosphorylierungssignale darauf normalisiert. PLN-Pentamere zeigten unter basalen Bedingungen eine ca. 2,4-fach stärkere PKA-abhängige Phosphorylierung an S16 als Monomere (Abbildung 10 A, $P < 0,05$). Neben der PKA-abhängigen S16-Phosphorylierung moduliert auch die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an T17 die SERCA2a-inhibitorische Aktivität von PLN. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungszustand von Monomeren und Pentameren an T17 untersucht. Im Gegensatz zur PKA-abhängigen Phosphorylierung war die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an T17 zwischen Monomeren und Pentameren nicht signifikant voneinander verschieden (Abbildung 10 B). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass PLN-Pentamere

unter basalen Bedingungen stärker an S16 phosphoryliert vorliegen als Monomere. Dieser Effekt schien zudem spezifisch für die PKA-abhängige Phosphorylierung zu sein, da er die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an T17 nicht betraf.

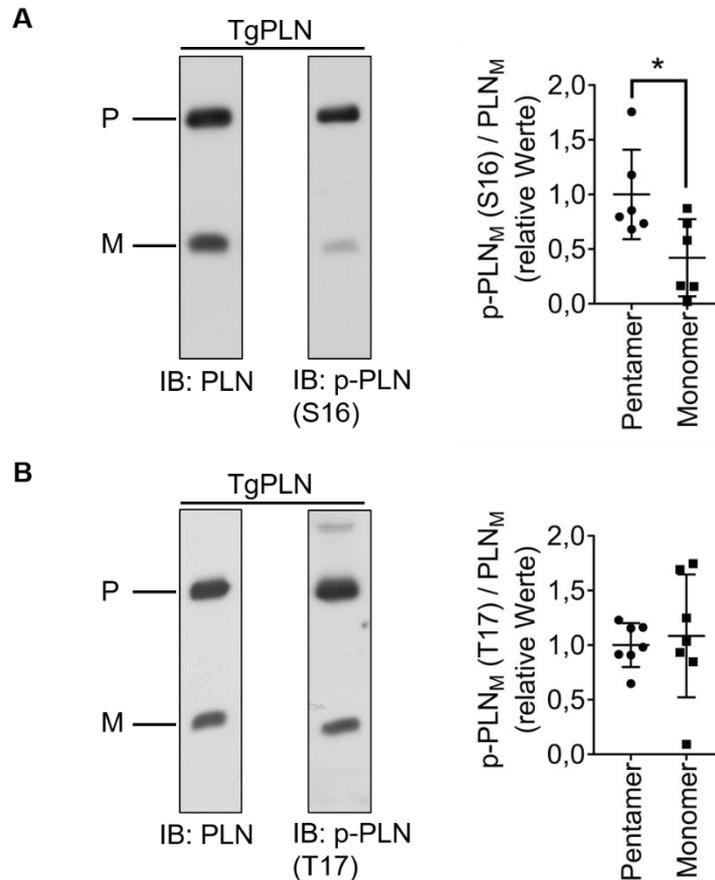


Abbildung 10 Untersuchung des basalen Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren und -Pentameren. Western blot-Analyse der beiden PLN-Phosphorylierungsstellen (S16 und T17) mittels phosphospezifischer Antikörper in Herzventrikel-Lysaten der Mauslinie TgPLN. P: Pentamer, M: Monomer, Mittelwert \pm SD, n=6-7, *P<0,05.

3.1.4 Das Verhältnis von PLN-Pentameren zu Monomeren in ventrikulären Herzgewebe-Lysaten der Maus in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand

Auf Grund von Ergebnissen aus *in vitro* Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass PLN-Pentamere als rein passive, inaktive PLN-Fraktion eine Rolle bei der Speicherung inaktiver Monomere besitzen^{32,51,52}. Grundlage für diese Hypothese war die Beobachtung, dass PLN-Monomere SERCA2a direkt inhibieren. Zudem schlugen diese Studien ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Pentameren und Monomeren in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand vor, wobei inaktive, phosphorylierte Monomere verstärkt Pentamere bilden. Da dies eine mögliche Ursache für die beobachtete verstärkte Phosphorylierung von Pentameren darstellte, wurde eine Beteiligung dieser Mechanismen im Mausmodell näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Mengenverhältnisse von Pentameren und Monomeren in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand quantifiziert.

Dabei wurden Herzventrikel-Lysate von narkotisierten (basal) und mit Isoproterenol stimulierten Mäusen verglichen. Hierbei führt Isoproterenol zu einer Aktivierung der PKA, was im Vergleich zu basalen Bedingungen in einer Zunahme der PLN-Phosphorylierung an S16 resultiert. *western blot*-Analysen der Mauslinie TgPLN zeigten unter basalen Bedingungen ein mittleres Verhältnis von Pentameren zu Monomeren von 1,9 : 1. Die Stimulation mit Isoproterenol führte zu einer deutlichen Zunahme der PLN-Phosphorylierung an S16. Nach Stimulation zeigte sich keine signifikante Veränderung des Verhältnisses von Pentameren zu Monomeren (Abbildung 11). Eine Veränderung dieses Verhältnisses in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands scheint somit in Mausherzen nicht für die stärkere Pentamerphosphorylierung verantwortlich zu sein.

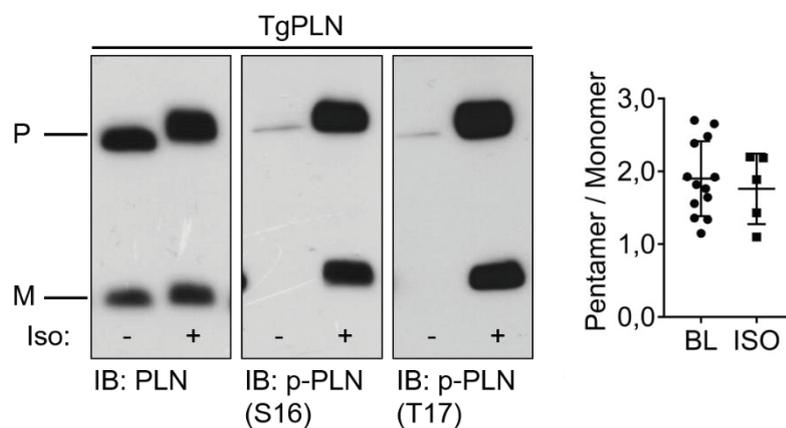


Abbildung 11 Untersuchung der Abhängigkeit des Verhältnisses von Pentameren zu Monomeren vom Phosphorylierungszustand. *Western blot*-Analysen von Herzventrikel-Lysaten der Mauslinie TgPLN unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Isoproterenol (10^{-7} M, i. p.). P: Pentamer, M: Monomer, BL: Basalbedingungen, ISO: Isoproterenol, Mittelwert \pm SD, n=5-13.

3.1.5 Basaler Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 in TgPLN und TgAFA

Im Folgenden wurde der Phosphorylierungszustand der funktionell aktiven, SERCA2a-inhibitorischen PLN-Monomere in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren untersucht. Hierzu wurden *western blot*-Analysen mit einem anti-phospho-PLN (S16) Antikörper in Herzventrikel-Lysaten der Mauslinien TgPLN und TgAFA durchgeführt. Die Bestimmung der Gesamtmenge an PLN erfolgte mittels anti-PLN-Antikörper. Die Signale von S16-phosphorylierten PLN-Monomeren wurden auf die Gesamtmenge an PLN-Monomeren normalisiert. Da die Linie TgAFA auf Grund der fehlenden Pentamerbildung eine etwa zweifach größere Menge an Monomeren besitzt, wurden vergleichbare Mengen an PLN-Monomeren analysiert. Auf diese Weise konnte die Signalquantifizierung für beide Mauslinien vergleichend auf derselben PVDF-Membran im linearen Bereich der Detektion durchgeführt werden. Die Aktivität der PKA und damit der S16-Phosphorylierungszustand von PLN hängen direkt von der Sympathikusaktivität ab. Deshalb wurde versucht, diesen externen Faktor in den Analysen des basalen Phosphorylierungszustands weitgehend zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurden narkotisierte Mäuse für diese Analysen verwendet (basal, BL). Unter basalen Bedingungen lagen Pentamere in der Mauslinie TgPLN im Vergleich zu den Monomeren etwa zweifach stärker S16-phosphoryliert vor. In Herzventrikel-Lysaten der Mauslinie TgAFA wurden dagegen keinerlei Pentamere detektiert. Es zeigte sich eine 3,3-fach stärkere S16-Phosphorylierung von PLN-Monomeren, wenn keine Pentamere zugegen waren (Abbildung 12, $P < 0,001$). Das Vorhandensein von Pentameren reduzierte folglich die PKA-abhängige PLN-Phosphorylierung (S16) von Monomeren.

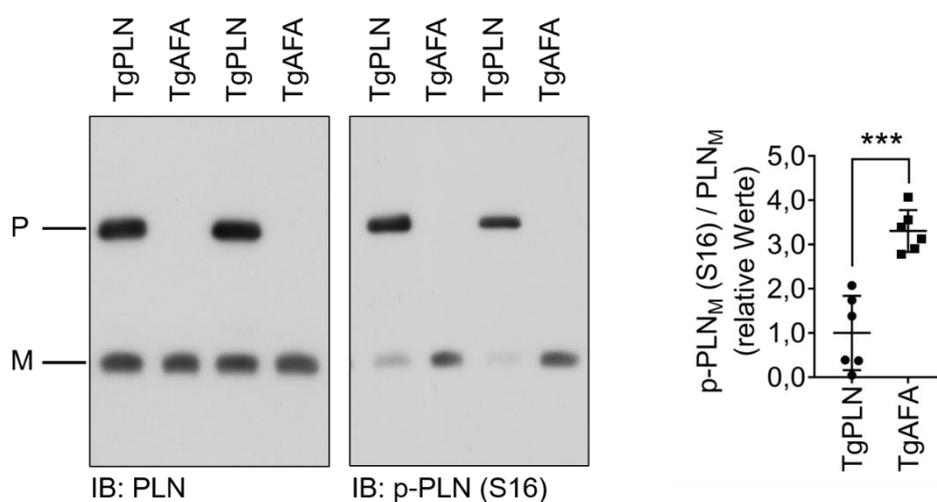


Abbildung 12 Die PKA-abhängige S16-Phosphorylierung von PLN-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren. *Western blot*-Analyse der PLN-Monomerphosphorylierung (S16) in je zwei repräsentativen Herzventrikel-Lysaten der Mauslinien TgPLN und TgAFA unter basalen Bedingungen. Es wurden vergleichbare Mengen an Monomeren eingesetzt und quantifiziert. P: Pentamer, M: Monomer, p-PLN_M: phosphorylierte PLN-Monomere, PLN_M: Gesamtmenge and PLN-Monomeren, Mittelwert \pm SD, $n=6$, *** $P < 0,001$.

3.1.6 Basaler Phosphorylierungszustand der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle T17 in TgPLN und TgAFA

Da die PLN-Aktivität auch über die CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle T17 reguliert wird, wurde der Phosphorylierungszustand dieser Stelle in den Mauslinien TgPLN und TgAFA untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein anti-phospho-PLN (T17)-Antikörper verwendet. Wie in den vorausgegangenen Versuchen zum Phosphorylierungszustand an S16 wurden auch hier vergleichbare Mengen an PLN-Monomeren analysiert und die Mäuse vor Tötung narkotisiert. Der Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren an T17 zeigte sich durch die Abwesenheit von Pentameren unbeeinflusst (Abbildung 13). Zusammenfassend führte das Vorhandensein von Pentameren unter basalen Bedingungen zu einer Reduktion der Phosphorylierung an S16, jedoch nicht an T17.

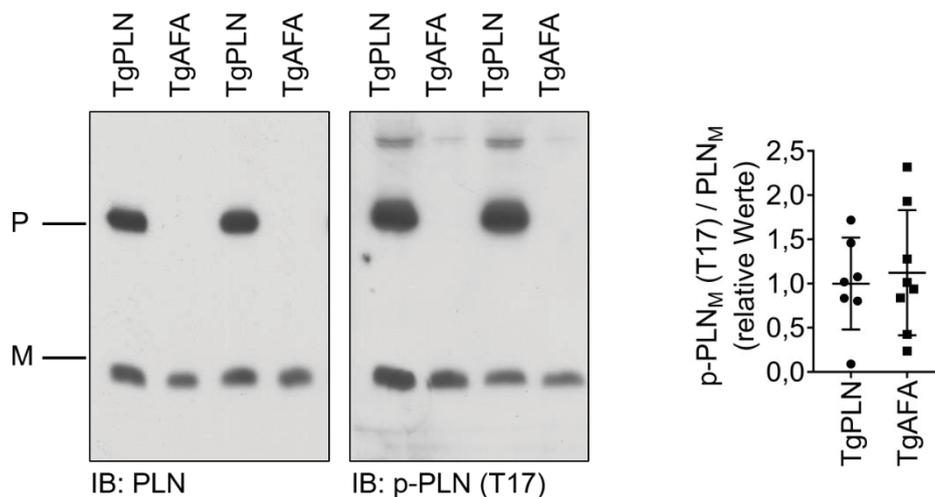


Abbildung 13 Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLN-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren. Western blot-Analyse der Monomerphosphorylierung (T17) in je zwei repräsentativen Herzventrikel-Lysanten der Mauslinien TgPLN und TgAFA unter basalen Bedingungen. Es wurden vergleichbare Mengen an Monomeren eingesetzt und quantifiziert. P: Pentamer, M: Monomer, p-PLN_M: phosphorylierte PLN-Monomere, PLN_M: Gesamtmenge an PLN-Monomeren, Mittelwert ± SD, n=7-8.

3.1.7 Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 in TgPLN und TgAFA nach Stimulation der PKA-Aktivität

Zur näheren Charakterisierung des beobachteten Effekts der reduzierten S16-Phosphorylierung von Monomeren in Anwesenheit von Pentameren, wurde der S16-Phosphorylierungszustand bei gesteigerter PKA-Aktivität untersucht. Hierzu wurden die Mäuse mit Isoproterenol (5 µg, i. p.) behandelt. Als β-Sympathomimetikum führt diese Substanz zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Als Folge steigt die Aktivität der PKA an. Die Behandlung führte in TgPLN und TgAFA zu einem Anstieg des Anteils S16-phosphorylierter PLN-Monomere. Im Gegensatz zu basalen Bedingungen zeigte der S16-Phosphorylierungszustand von Monomeren nach PKA-Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mauslinien (Abbildung 14).

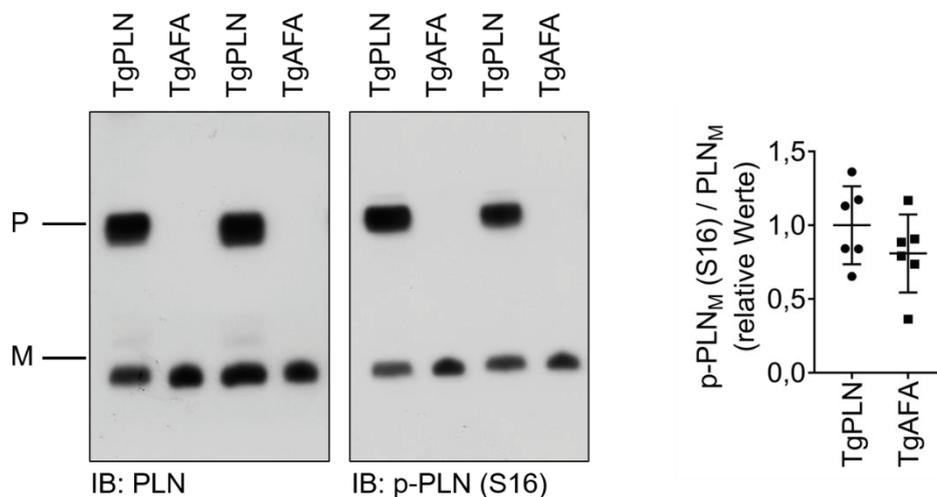


Abbildung 14 PKA-abhängige Phosphorylierung von PLN-Monomeren bei verstärkter PKA-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren. Western blot-Analyse der Monomerphosphorylierung (S16) in je zwei repräsentativen Herzventrikel-Lysaten der Mauslinien TgPLN und TgAFA nach Stimulation mit Isoproterenol (5 µg, i. p.). Es wurden vergleichbare Mengen an PLN-Monomeren eingesetzt und quantifiziert. P: Pentamer, M: Monomer, p-PLN_M: phosphorylierte PLN-Monomere, PLN_M: Gesamtmenge an PLN-Monomeren, IB: Immunoblot, Mittelwert ± SD, n=6.

Zusammengenommen verringerten PLN-Pentamere unter basalen Bedingungen die PKA-abhängige Phosphorylierung von Monomeren, während sie nach Stimulation der PKA-Aktivität eine ausgeprägte Phosphorylierung der Monomere zuließen. Der Effekt war unter basalen Bedingungen spezifisch für die PKA abhängige, jedoch nicht für die CaMKII-abhängige Phosphorylierung.

3.1.8 Untersuchung des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren mittels Phos-Tag™ SDS-PAGE

Da phosphospezifische Antikörper häufig keine absolute Spezifität für das phosphorylierte Epitop aufweisen, sollten die Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Unabhängig von phosphospezifischen Antikörpern gegen phospho-PLN (S16 bzw. T17) wurde

der Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren mittels Phos-Tag™ SDS-PAGE analysiert (Abbildung 15). Mit dieser Methode konnte phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes PLN im Gel getrennt und mit einem einzigen Antikörper in einem Bild beurteilt werden. Die Detektion phosphorylierter und nicht phosphorylierter Monomere erfolgte hierbei mittels anti-PLN-Antikörper. Im Gegensatz zur Mauslinie TgPLN lagen PLN-Monomere der Linie TgAFA unter basalen Bedingungen stärker ein- und zweifach phosphoryliert vor (Abbildung 15, links). In der Linie TgPLN lag der Großteil der Monomere unter diesen Bedingungen dephosphoryliert vor. Die Auftrennung der Monomere der Linien TgPLN und TgAFA in der Gelelektrophorese erwies sich technisch schwierig. Deshalb wurden dafür die Mauslinien TgF-PLN und TgF-AFA verwendet, da die N-terminale FLAG-Markierung die Auftrennung von Monomeren mit dieser Methode verbesserte (Abbildung 15, rechts). Die Detektion erfolgte hier mittels anti-FLAG-Antikörper. Unter basalen Bedingungen lagen die Monomere in der Mauslinie TgF-PLN wie in der Linie TgPLN überwiegend dephosphoryliert vor.

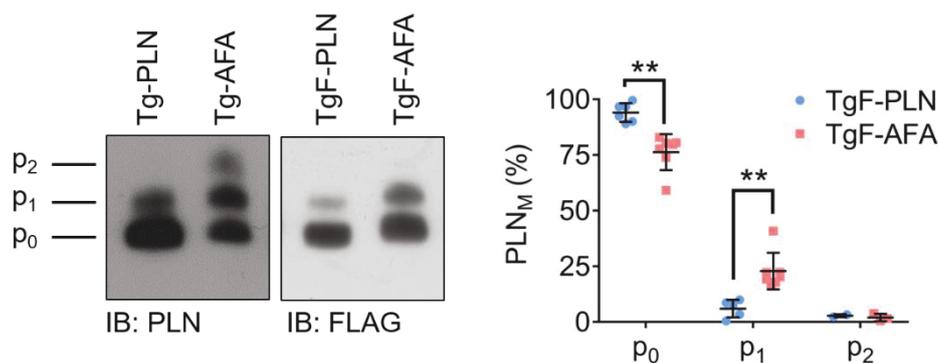


Abbildung 15 Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren (PLN_M) in der An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren mittels phosphate mobility shift assay (Phos-Tag™). Phos-Tag™-Analysen von PLN- bzw. PLN-AFA-Monomeren ohne (TgPLN und TgAFA) und mit N-terminaler FLAG-Markierung (TgF-PLN und TgF-AFA). PLN_M: PLN-Monomere; p₀: unphosphorylierte Monomere; p₁: einfach phosphorylierte Monomere; p₂: zweifach phosphorylierte Monomere; Mittelwert ± SD, n=6-7 Mäuse, multiple t-Tests, P-Wert korrigiert für multiples Testen nach der Holm-Sidak-Methode, **P<0,01.

Der Anteil zweifach phosphorylierter Monomere lag in den Mauslinien TgF-PLN und TgF-AFA bei weniger als 3 % und in einigen Fällen unterhalb der Detektionsgrenze. In Abwesenheit von Pentameren zeigte sich in der Mauslinie TgF-AFA ein 3,8-fach höherer Anteil einfach phosphorylierter PLN-Monomere im Vergleich zu TgF-PLN (TgF-PLN: 6 %, TgF-AFA: 22,8 %, $P<0,01$). Der Anteil nicht phosphorylierter, aktiver Monomere war dagegen in der Linie TgF-AFA signifikant reduziert (TgF-PLN: 94 %, TgF-AFA: 76,3 %, $P<0,01$). Somit konnte das Ergebnis einer geringeren Phosphorylierung von Monomeren in der Anwesenheit von Pentameren unabhängig von phosphospezifischen Antikörpern in zwei zusätzlichen unabhängigen Mausmodellen bestätigt werden. Durch Verwendung dieser Methode konnte die Veränderung des Phosphorylierungszustands zudem mit zwei weiteren Antikörpern (anti-PLN und anti-FLAG) bestätigt werden.

3.1.9 Phosphorylierungszustand von PLN-Pentameren nach β -adrenerger Stimulation

Zur weiteren Abklärung der Mechanismen, durch die Pentamere den S16-Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren beeinflussten, wurde der Phosphorylierungszustand von Pentameren mittels Phos-Tag™ analysiert. Hierzu wurde die Mauslinie TgF-PLN verwendet, da die N-terminale FLAG-Markierung die Auftrennung der Pentamere mit dieser Methode ermöglichte. Unter basalen Bedingungen zeigten Pentamere in der Phos-Tag™-Analyse vier Banden (Abbildung 16). Nach β -adrenerger Stimulation (Isoproterenol, 5 μ g, i. p.) zeigte sich eine Zunahme der Pentamerphosphorylierung an S16 (Abbildung 16, rechts). Da jedes Protomer eines Pentamers zwei Phosphorylierungsstellen besitzt, wären insgesamt 11 Phosphorylierungszustände für PLN-Pentamere möglich (nicht-phosphoryliert und 1-10 Phosphorylierungen). Da in der Mauslinie TgF-PLN jedoch Heteropentamere verschiedener Mengenverhältnisse von F-PLN und PLN vorliegen, welche durch die etwa 1 kDa große N-terminale FLAG-Markierung unterschiedliche Massen besitzen, konnten die Banden in dieser Analyse nicht zweifelsfrei der Anzahl der Phosphatreste eines Pentamers zugeordnet werden. Das Vorliegen von Heteropentameren führt im Vergleich zu Wildtyp-PLN-Pentameren zu einer noch größeren Zahl theoretisch möglicher Banden in der Phos-Tag™-Analyse, da jede Heteropentamerspezies theoretisch diese 11 Phosphorylierungszustände besitzt. Trotz β -adrenerger Stimulation mit einer hohen Dosis Isoproterenol wurden hier jedoch nur maximal sechs Banden identifiziert. Das theoretische Maximum der Pentamerphosphorylierung wurde dementsprechend nach β -adrenerger Stimulation nicht erreicht. Unter denselben Bedingungen β -adrenerger Stimulation zeigte die S16-Phosphorylierung der PLN-Monomere in An- oder Abwesenheit von Pentameren keine Unterschiede (vgl. 3.1.7, Abbildung 14). Zusammenfassend erlauben PLN-Pentamere die uneingeschränkte S16-Phosphorylierung der Monomere bereits bei submaximaler Pentamerphosphorylierung.

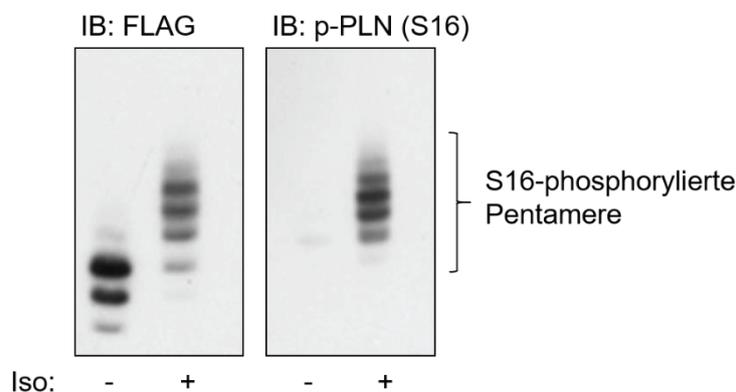


Abbildung 16 Analyse des Phosphorylierungszustands von PLN-Pentameren in der Mauslinie TgF-PLN mittels phosphate mobility shift assay (Phos-Tag™). Die Analyse erfolgte in Herzventrikel-Lysaten narkotisierter (-Iso) und mit Isoproterenol stimulierter (+Iso) Mäuse. IB: Immunoblot, FLAG: anti-FLAG-Antikörper, p-PLN (S16): anti-phospho-PLN (S16)-Antikörper, Iso: Isoproterenol.

3.1.10 Phosphorylierungszustand weiterer Zielproteine der PKA in den Mauslinien TgPLN und TgAFA

Die beobachteten Unterschiede in der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLN-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von Pentameren warfen die Frage auf, inwiefern diese durch Unterschiede in der Aktivität der PKA zwischen den verwendeten Mauslinien beruhen. Um diese Frage zu adressieren, wurde der Phosphorylierungszustand weiterer PKA-abhängiger Phosphorylierungsstellen in den Mauslinien TgPLN und TgAFA mittels phosphospezifischer Antikörper untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Phosphorylierungszustände der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen von kardialem Troponin I (cTnI, S23/24) und Ryanodinrezeptor-2 (RyR2, S2808) analysiert (Abbildung 17). Die Signale der phosphospezifischen Antikörper wurden dabei auf die Gesamtmengen des jeweiligen Proteins in der Probe normalisiert. Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Phosphorylierungszustands von Troponin I an den Serinresten 23 und 24.

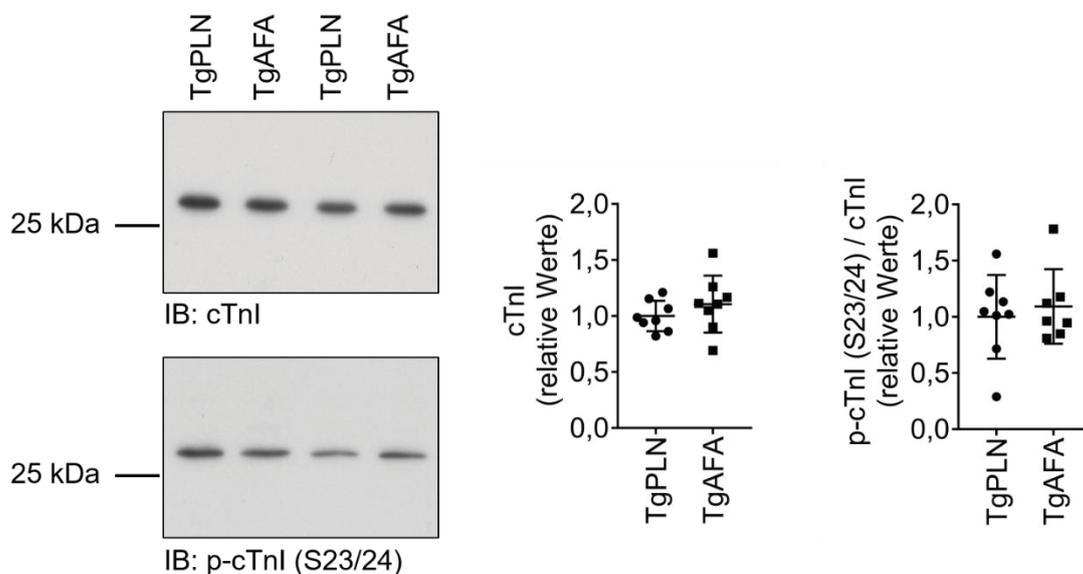


Abbildung 17 Die Expression und PKA-abhängige Phosphorylierung von Troponin-I in den Mauslinien TgPLN und TgAFA. Western blot-Analyse von je zwei repräsentativen Herzventrikel-Lysaten der Linien TgPLN und TgAFA. cTnI: kardiales Troponin-I, p-cTnI: phosphoryliertes kardiales Troponin-I (S23/24), Mittelwert \pm SD, n=7-8.

Zur Analyse des Phosphorylierungszustands von Ryanodinrezeptor-2 (RyR2) an S2808 wurden Mikrosomenpräparationen aus den Herzventrikeln beider Mauslinien verwendet. Hierbei war der Phosphorylierungszustand zwischen den beiden Mauslinien nicht signifikant voneinander verschieden (Abbildung 18).

Eine unterschiedliche PKA-Aktivität zwischen den Mauslinien TgPLN und TgAFA scheint demnach nicht ursächlich für die beobachtete Veränderung des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren in Abwesenheit von Pentameren zu sein.

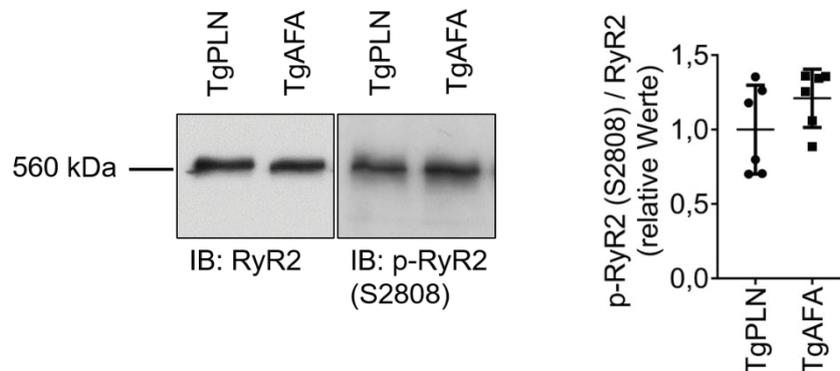


Abbildung 18 Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Ryanodinrezeptor-2 in den Mauslinien TgPLN und TgAFA. Western blot-Analyse von Mikrosomenpräparationen aus Herzventrikeln der Linien TgPLN und TgAFA. RyR2: Ryanodinrezeptor-2; p-RyR2 (2808): S2808-phosphorylierter Ryanodinrezeptor-2; Mittelwert \pm SD, n=6.

3.1.11 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN und HAX-1 in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren

Da HAX-1 etwa 50 % der SERCA2a Inhibition durch PLN vermittelt⁵⁷, wurde dessen Interaktion mit PLN in der An- bzw. Abwesenheit von Pentameren untersucht. Zu diesem Zweck wurden Co-Immunopräzipitationsversuche durchgeführt. Da die Proteinexpression von HAX-1 in Kardiomyozyten gering ausgeprägt ist, wurden für diesen Versuch transfizierte HEK293-Zellen als Modell verwendet. Diese Zellen exprimieren endogen das ~32 kDa große HAX-1 und wurden mit N-terminal FLAG-markiertem PLN (F-PLN) bzw. PLN-AFA (F-AFA) transfiziert. Durch Verwendung der N-terminalen FLAG-Markierung konnte die Immunopräzipitation mittels anti-FLAG-Antikörpern durchgeführt werden. Dies war nötig, um die Effizienz der Immunopräzipitation und damit die Ausbeute an immunopräzipitiertem PLN zu steigern. Nach der Immunopräzipitation wurde co-immunopräzipitiertes HAX-1 mittels *western blot* und anti-HAX-1-Antikörper detektiert. Es wurden vergleichbare Gesamtmengen von F-PLN und F-AFA immunopräzipitiert (Abbildung 19, links). Die mit F-PLN und F-AFA co-immunopräzipitierten Mengen von HAX-1 waren ebenfalls vergleichbar (Abbildung 19, rechts). Eine veränderte Interaktion mit HAX-1 scheint demnach nicht für die beobachteten Unterschiede bezüglich der SERCA2a-Inhibition verantwortlich zu sein. Darüber hinaus scheint die Protein-Protein-Interaktion von HAX-1 und PLN unabhängig vom Oligomerisierungszustand stattzufinden. Als Kontrolle für eine mögliche unspezifische, von PLN unabhängige Präzipitation von HAX-1 während der Co-Immunopräzipitation wurden mit unmarkiertem PLN transfizierte Zellen verwendet. Im anti-FLAG-Präzipitat dieses Zelllysats zeigte sich eine sehr schwache HAX-1 Bande, welche die unspezifische Bindung von HAX-1 an die präzipitierten Dynabeads[®] widerspiegelt.

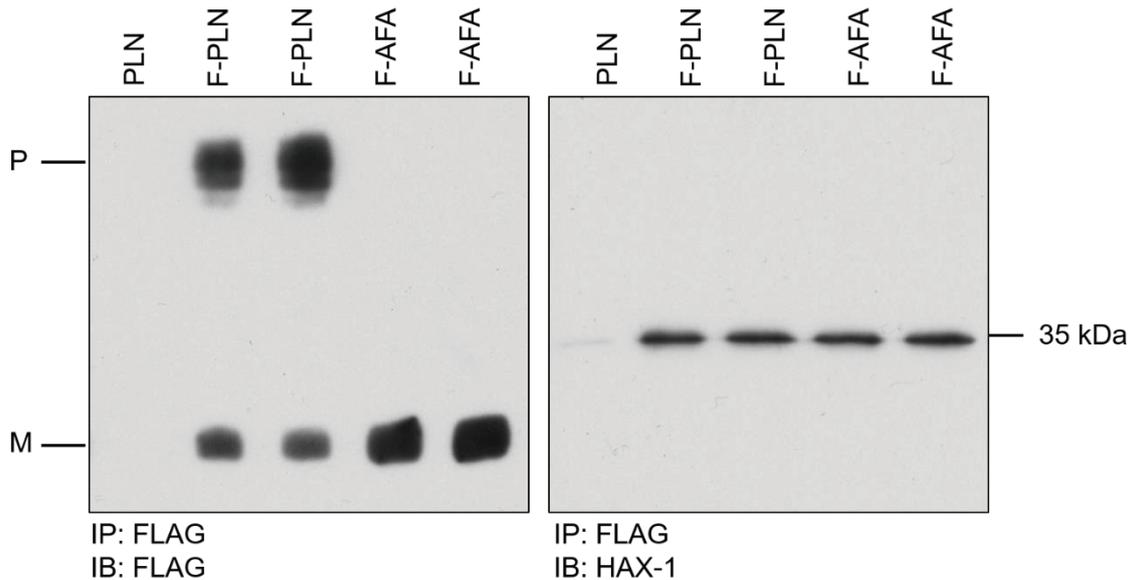


Abbildung 19 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN und HAX-1 in An- und Abwesenheit von PLN-Pentameren. Co-Immunopräzipitationsversuche in transfizierten HEK293-Zellen zeigten vergleichbare Mengen von gebundenem HAX-1 zwischen F-PLN und F-PLN-AFA. F-PLN / F-PLN-AFA: N-terminal FLAG-markiertes PLN bzw. PLN-AFA; PLN: wildtypisches Phospholamban; IP: Immunopräzipitation; IB: Immunoblot; P: Pentamer; M: Monomer.

3.2 Die Bedeutung von PLN-Pentameren für die Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie

Die von Schmitt et al. identifizierte heterozygote PLN-Mutation R9C führt in der 2. bis 3. Lebensdekade zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie in Menschen⁵⁵. Der zu Grunde liegende Mechanismus beruht auf der Unterdrückung der Phosphorylierung von Wildtyp-PLN, das im heterozygoten Organismus etwa gleich stark exprimiert vorliegt wie PLN-R9C. Als Folge dessen kommt es zu einer übermäßigen Inhibition von SERCA2a. Dieser dominant wirkende Phosphorylierungsdefekt des PLN wurde als pathogenetische Ursache für die spätere Erkrankung postuliert^{55,95}. Im Folgenden sollte der Phosphorylierungsdefekt näher charakterisiert werden und die Hypothese überprüft werden, inwiefern PLN-Pentamere für die Pathogenese der Erkrankung von Bedeutung sein könnten.

3.2.1 Mauslinien zur Charakterisierung des dominanten Phosphorylierungsdefekts von PLN-R9C

Zur Charakterisierung des Phosphorylierungszustands von PLN-R9C sowie Wildtyp-PLN wurden die zur Verfügung gestellten Mauslinien TgF-R9C und TgF-PLN verwendet. Diese exprimieren N-terminal FLAG-markiertes PLN (TgF-PLN) bzw. PLN-R9C (TgF-R9C) kardiomyozytenspezifisch unter der Kontrolle des *myh6*-Promotors (Abbildung 20).

Die N-terminale FLAG-Markierung wurde verwendet, da die R9C-Mutation zur Zerstörung des Epitops für kommerziell erhältliche anti-PLN-Antikörper führt. Somit konnte PLN trotz

R9C-Mutation mittels anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. Zum Vergleich mit wildtypischem PLN wurde die Linie TgF-PLN verwendet. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von PLN-R9C-Pentameren an der Pathogenese der Erkrankung wurde zusätzlich die Mauslinie TgF-AFA-R9C verwendet. Auch in dieser Mauslinie erfolgte die Expression des Transgens unter Kontrolle des *myh6*-Promotors. Beim exprimierten Protein handelt es sich um eine N-terminal FLAG-markierte Kombination aus PLN-AFA- und PLN-R9C-Mutationen (F-AFA-R9C). Die AFA-Mutationen führt dabei wie in 3.1.1 erläutert zu einer Unterdrückung der Bildung von PLN-Pentameren. Somit konnte der Einfluss der R9C-Mutation auf den Phosphorylierungszustand von endogenem Wildtyp-PLN untersucht werden, ohne dass PLN-R9C an einer Pentamerbildung beteiligt war. Da alle drei Mauslinien am N-Terminus der Transgene ein FLAG-Epitop tragen, konnten die verschiedenen PLN-Varianten mit demselben Antikörper bei gleicher Bindungsaffinität detektiert werden.

Alle hier genannten Mauslinien exprimierten zusätzlich zu den Transgenen endogenes Wildtyp-PLN. Frühere Untersuchungen, durchgeführt von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt,

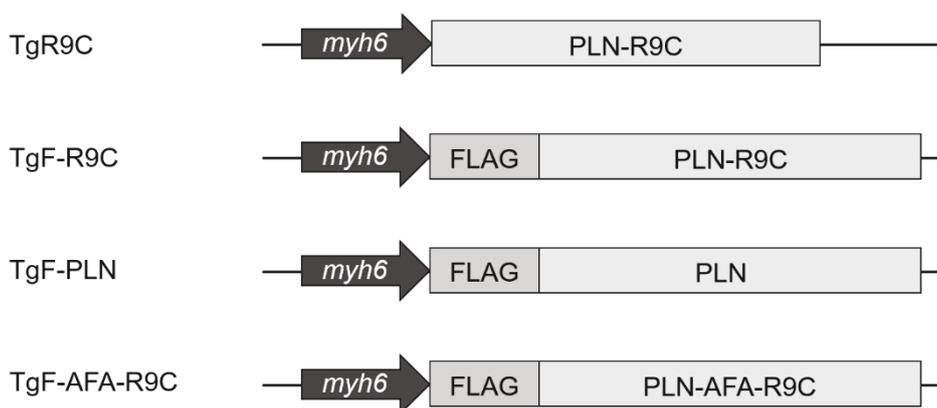


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Transgenkonstrukte der Mauslinien TgR9C, TgF-R9C, TgF-PLN und TgF-AFA-R9C. *myh6*: α -myosin heavy chain Promotor, FLAG: N-terminale Markierung mit FLAG-Epitop.

zeigten, dass die Mauslinie TgF-R9C ebenso wie die Linie TgR9C altersabhängig eine dilatative Kardiomyopathie entwickelte und phänotypisch nicht von altersgleichen Mäusen der Linie TgR9C zu unterscheiden war.

3.2.2 Untersuchung der Oligomerisierung von F-R9C

Zunächst sollten die N-terminal FLAG-markierten PLN-Konstrukte F-PLN und F-R9C in den beiden Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Oligomerisierung charakterisiert werden. Da das FLAG-Peptid ca. 1 kDa groß ist, wanderten die FLAG-markierten Proteine während der Elektrophorese langsamer durch das Gel und wurden im *western blot* entsprechend oberhalb des endogenen PLN detektiert. Da auch F-R9C nicht vom PLN Antikörper erkannt wurde (Abbildung 21, rechts), konnten F-R9C (mittels anti-FLAG-Antikörper) und endogenes, wildtypisches PLN (mittels anti-PLN-Antikörper) klar voneinander abgegrenzt untersucht werden. In *western blot*-Analysen zeigte F-PLN

Pentamere und Monomere. F-R9C zeigte im Vergleich zu F-PLN eine zusätzliche Bande bei ~15 kDa (Abbildung 21, links). Unter reduzierenden Bedingungen war diese nicht zu detektieren (Abbildung 21, Mitte). Im Einklang mit Ha *et al.*⁹⁶ handelt es sich bei dieser Bande wahrscheinlich um Dimere, welche PLN-R9C nach Oxidation bildet. Darüber hinaus zeigte F-R9C im Vergleich zu F-PLN zusätzliche Banden im Molekulargewichtsbereich >35 kDa. Auch diese Proteinaggregate wurden unter reduzierenden Bedingungen nicht detektiert. Endogene PLN-Pentamere zeigten in den Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ein unterschiedliches Bandenmuster. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten sich die zusätzlichen Banden oberhalb von 25 kDa. Diese wurden sowohl mit dem anti-FLAG- als auch dem anti-PLN-Antikörper detektiert, was ebenso wie das höhere Proteingewicht auf eine Bildung von Heteropentameren zwischen endogenem PLN und dem durch die FLAG-Markierung etwa 1 kDa größeren F-PLN bzw. F-R9C schließen lässt. Zusammenfassend ist festzustellen, dass F-R9C unter Beteiligung des Cysteins an Position 9 verschiedene disulfidbrückenabhängige Proteinaggregate bildet und wie F-PLN mit endogenem, wildtypischen PLN innerhalb der Pentamere interagieren kann.

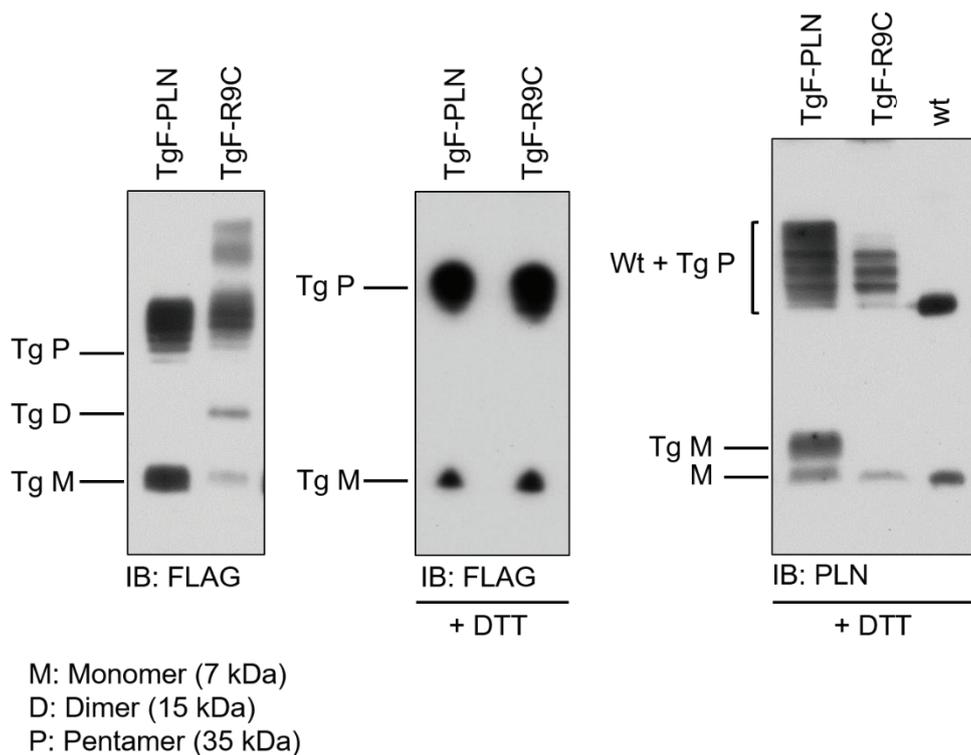


Abbildung 21 Untersuchung der Oligomerisierung von F-R9C. Western blot-Analyse von Herzventrikel-Lysaten der Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C im Vergleich mit Lysaten wildtypischer Mäuse. Wt: Wildtyp, Tg: Transgen, M: Monomer, D: Dimer, P: Pentamer, DTT: Dithiothreitol, IB: Immunoblot

3.2.3 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen F-R9C und SERCA2a

Da die R9C-Mutation zur Bildung verschiedener disulfidbrückenabhängiger PLN-Oligomere bzw. Proteinaggregate führte, stellte sich die Frage, inwiefern dies und/oder die R9C-Mutation *per se* die Interaktion mit SERCA2a beeinflusst. Aus diesem Grund wurden Co-Immunopräzipitationsversuche in transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit N-terminal FLAG-markierter SERCA2a (F-SERCA2a) zusammen mit N-terminal Myc-markiertem PLN bzw. PLN-R9C co-transfiziert (Myc-PLN bzw. Myc-R9C). Die Immunopräzipitation erfolgte mittels FLAG-Antikörper. Zur besseren Vergleichbarkeit der gebundenen Mengen an Myc-PLN und Myc-R9C wurde die Elution unter reduzierenden

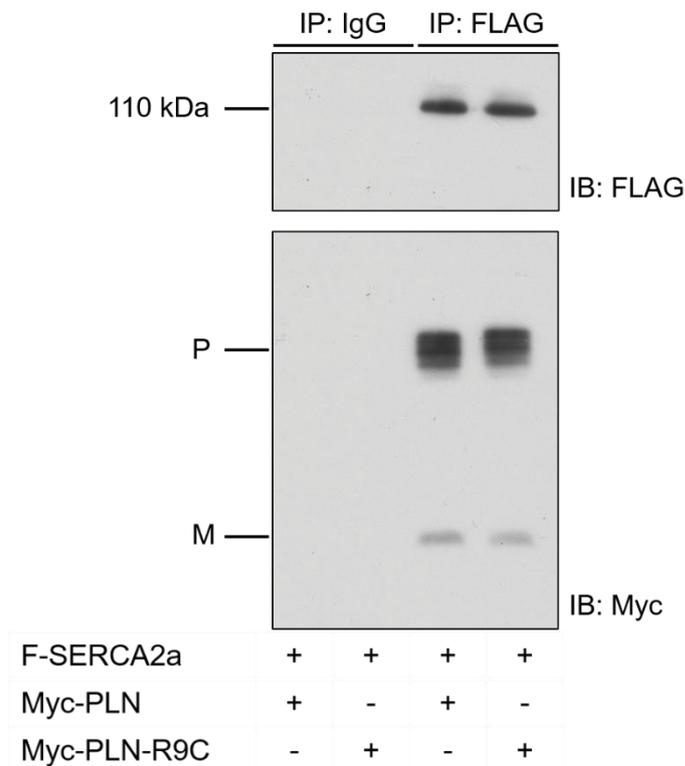


Abbildung 22 Untersuchung des Einflusses der R9C-Mutation auf die Protein-Protein-Interaktion von PLN und SERCA2a. Co-Immunopräzipitationsversuche in transfizierten HEK293-Zellen zeigten vergleichbare Mengen an SERCA2a-gebundenem Myc-PLN bzw. Myc-PLN-R9C. F-SERCA2a: N-terminal FLAG-markierte SERCA2a; Myc-PLN / Myc-PLN-R9C: N-terminal Myc-markiertes PLN bzw. PLN-R9C; IP: Immunopräzipitation; IB: Immunoblot; P: Pentamer; M: Monomer.

Bedingungen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Versuche zusätzlich mit einer Mischung unspezifischer IgG-Antikörper anstelle des anti-FLAG-Antikörpers durchgeführt. In den Kontrollen wurde weder F-SERCA2a noch Myc-PLN bzw. Myc-R9C detektiert (Abbildung 22, links). Mit dem anti-FLAG-Antikörper wurden vergleichbare Mengen an F-SERCA2a immunopräzipitiert (Abbildung 22, oben). Die co-immunopräzipitierten Mengen von Myc-PLN und Myc-R9C waren ebenfalls vergleichbar (Abbildung 22, rechts). Es wurden in beiden Fällen Pentamere und Monomere co-immunopräzipitiert. Die R9C-Mutation beeinflusste die an SERCA2a gebundene Menge an PLN demnach nicht.

3.2.4 Untersuchung des Phosphorylierungszustands von F-PLN und F-R9C mittels Phos-Tag™

Die von Schmitt *et al.*⁵⁵ gezeigte verstärkte Inhibition von SERCA2a in der Anwesenheit von PLN-R9C beruhte auf einer Unterdrückung der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLN. Mechanistisch wurde eine verstärkte PKA-Bindung durch PLN-R9C und eine damit einhergehende verringerte Phosphorylierung von Wildtyp-PLN diskutiert. Der Phosphorylierungszustand des PLN-R9C selbst wurde hier nicht direkt untersucht, zumal da keiner der kommerziell erhältlichen anti-PLN-Antikörper bzw. anti-p-PLN (S16)-Antikörper PLN-R9C detektiert. Diese methodische Limitierung konnte durch Verwendung der Mauslinie TgF-R9C überwunden werden, weil PLN-R9C hier mittels anti-FLAG-Antikörper detektiert werden kann. In Kombination mit der Phos-Tag™-Analyse, die phosphoryliertes und unphosphoryliertes Protein während der Gelelektrophorese trennt, ermöglichte dies die Quantifizierung des Phosphorylierungszustands von PLN-R9C in Herzgewebe-Lysaten. Abbildung 23 zeigt die Spezifität des verwendeten anti-FLAG-Antikörpers. Auch nach längerer Belichtungsdauer wurden keinerlei unspezifische Banden in Herzgewebe-Lysaten aus Wildtyp-Mäusen detektiert.

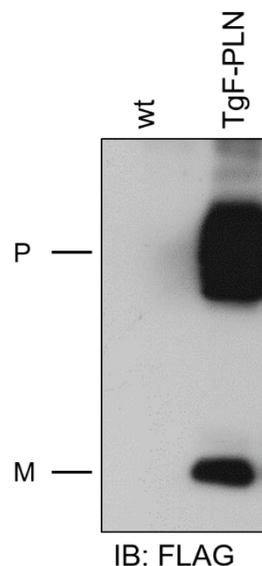


Abbildung 23 **Der verwendete FLAG-Antikörper ist spezifisch für das FLAG-Epitop.** In *western blot*-Analysen zeigte der verwendete FLAG-Antikörper keinerlei unspezifische Banden in Herzgewebe-Lysaten wildtypischer Mäuse. Wt: Wildtyp; IB: Immunoblot; P: Pentamer; M: Monomer.

Herzgewebe-Lysate der Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C wurden anschließend mittels Phos-Tag™ gelelektrophoretisch aufgetrennt und vergleichend analysiert. Zur Verhinderung der Bildung von weiteren Oligomeren oder Aggregaten in Anwesenheit der R9C-Mutation erfolgte die Analyse unter reduzierenden Bedingungen. Unter basalen Bedingungen zeigte sich bei TgF-R9C eine stärkere Phosphorylierung der Pentamere als bei TgF-PLN (Abbildung 24, oben, p-P). Die Phosphorylierung der FLAG-markierten Monomere war in beiden Fällen

schwach ausgeprägt und lag in vielen Proben unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 24, oben, p₁). Nach thermischer Zerlegung der Pentamere zeigte sich, dass TgF-R9C insgesamt etwa um 50 % stärkere Phosphorylierungssignale als TgF-PLN aufwies (Abbildung 24, unten). Auf Grund der kaum detektierten Phosphorylierung der Monomere (Abbildung 24, p₁) legte dies den Schluss nahe, dass die beobachteten Unterschiede im Phosphorylierungszustand von F-PLN und F-R9C überwiegend aus den Pentameren stammten und F-R9C in diesen stärker phosphoryliert vorliegt als F-PLN.

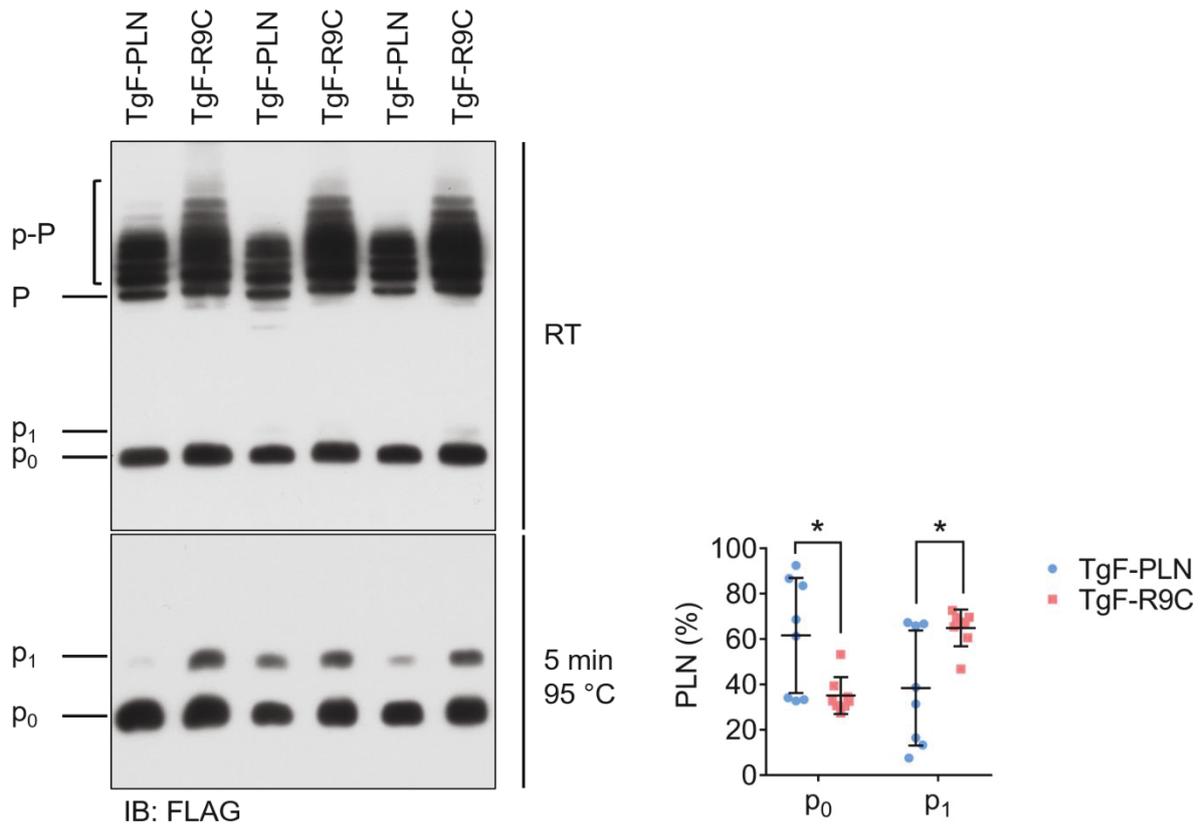


Abbildung 24 Vergleich des basalen Phosphorylierungszustands von F-PLN und F-R9C in den Mauslinien TgF-PLN und TgF-R9C. Phos-Tag™-Analyse der Phosphorylierung des F-PLN bzw. F-PLN-R9C-Transgens in je drei repräsentativen Herzventrikel-Lysaten der Mauslinien TgF-PLN und TgF-PLN-R9C. Zur besseren Vergleichbarkeit und zur Quantifizierung wurden die Pentamere thermisch (5 min, 95 °C) in Monomere zerlegt (unten). RT: Raumtemperatur; p₀: unphosphorylierte Monomere; p₁: Monomere mit einer Phosphorylierung; P: unphosphorylierte Pentamere; p-P: phosphorylierte Pentamere; Mittelwerte ± SD, n=8, multiple *t*-Tests, P-Wert korrigiert für multiples Testen nach der Holm-Sidak-Methode, *P<0,05.

3.2.5 Phosphorylierungszustand von endogenem Wildtyp-PLN in Anwesenheit von F-R9C oder F-AFA-R9C

Die vorangegangenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in Pentameren vorliegendes PLN-R9C stärker phosphoryliert vorliegt als Wildtyp-PLN. Auf Grund dieses Befundes wurde im Folgenden die Hypothese überprüft, dass sich der durch PLN-R9C hervorgerufene Phosphorylierungsdefekt hauptsächlich in Heteropentameren aus wildtypischem und mutiertem PLN abspielt. Hierzu wurde der Phosphorylierungszustand von endogenen, wildtypischen PLN-Monomeren in den Mauslinien TgF-R9C und TgF-AFA-R9C verglichen. Vorarbeiten von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) haben gezeigt, dass die Überlebensspanne von Mäusen mit der PLN-AFA-R9C Mutation länger als die von Mäusen mit der PLN-R9C Mutation ist (Abbildung 25). Mäuse der Mauslinie TgR9C entwickeln dabei altersabhängig eine dilatative Kardiomyopathie und versterben vorzeitig an terminaler Herzinsuffizienz. Auch dies

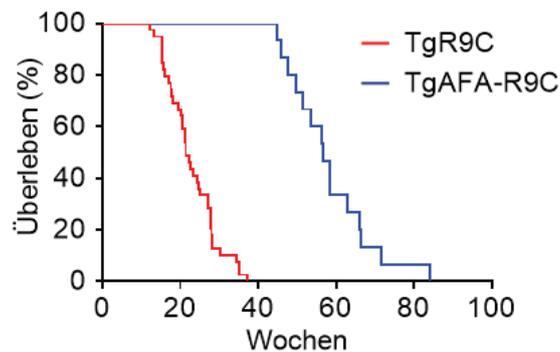


Abbildung 25 Kaplan-Meier Überlebenskurven der Mauslinien TgR9C und TgAFA-R9C (Log-rank (Mantel-Cox) test $P < 0,0001$). Die Daten dieser Abbildung wurden von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, erhoben.

war Grund für den Vergleich des PLN-Phosphorylierungszustands in den beiden Mauslinien, da dies eine mögliche Erklärung für den schwächeren Phänotyp der pentamerdefizienten Tg-AFA-R9C-Mäuse darstellen könnte.

Mäuse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mauslinie TgF-R9C entwickelten wie die Mauslinie TgR9C ebenfalls eine dilatative Kardiomyopathie und verstarben vorzeitig an Herzinsuffizienz, im Mittel im Alter von 33 ± 9 Wochen. Die N-terminale FLAG-Markierung von PLN-R9C verhindert also nicht die phänotypische Ausprägung der Mutation und verkürzt zugleich auch nicht zusätzlich die Lebensdauer dieser Mäuse. Die Mauslinie TgF-AFA-R9C lebte signifikant länger als die Mauslinie TgF-R9C ($P < 0,01$). Im Alter von 40 Wochen lebten von 11 TgF-AFA-R9C-Mäusen, die so lange beobachtet wurden, noch alle 11 Tiere.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungszustands des endogenen Wildtyp-PLN in TgF-R9C- und TgF-AFA-R9C-Herzgewebe wurden Phos-Tag™-Gele (zur elektrophoretischen Trennung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem PLN) und zur Proteindetektion anti-PLN-Antikörper (die Wildtyp-PLN, aber nicht die R9C-Mutante erkennen) verwendet. Da das Vorhandensein der AFA-Mutation auch die Bildung von endogenen Wildtyp-PLN-Pentameren beeinflusste, wurden für diese Versuche die eingesetzten Proteinmengen so gewählt, dass vergleichbare Mengen an PLN-Monomeren analysiert wurden. Die Phos-Tag™-Analysen zeigten einen etwa dreifach höheren Anteil phosphorylierter, endogener Wildtyp-PLN-Monomere in der Linie TgF-AFA-R9C (Abbildung 26, TgF-R9C vs. TgF-AFA-R9C: 23,5 % ± 16,5 % vs. 61,5 % ± 5,6 %, $P < 0,0001$). Entsprechend war der Anteil unphosphorylierter, aktiver endogener PLN-Monomere in der Mauslinie TgF-R9C signifikant höher als in TgF-AFA-R9C (76,4 % ± 16,5 % vs. 38,4 % ± 5,6 %, $P < 0,0001$). Unphosphorylierte Monomere stellen die PLN-Spezies dar, die SERCA2a am stärksten inhibieren.

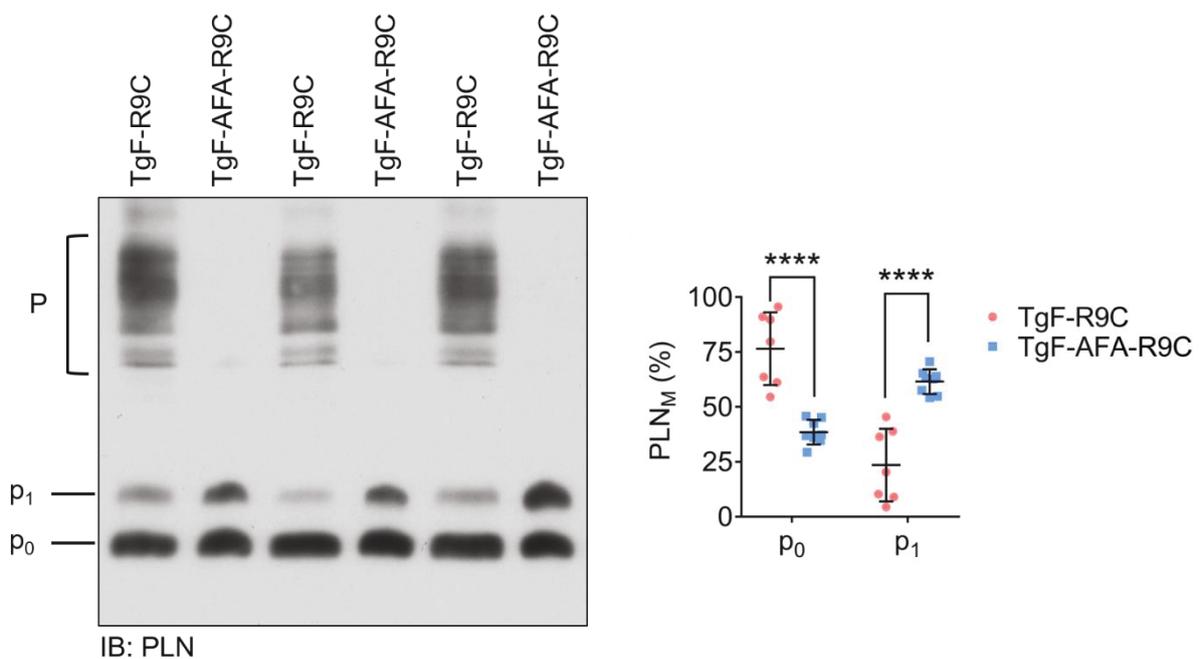


Abbildung 26 Analyse des Phosphorylierungszustands endogener, wildtypischer PLN-Monomere in den Mauslinien TgF-R9C und TgF-AFA-R9C mittels Phos-Tag™. Gezeigt sind je drei repräsentative Herzventrikel-Lysate. p₀: unphosphorylierte Monomere; p₁: einfach phosphorylierte Monomere; P: Pentamere; PLN_M: PLN-Monomere; IB: Immunoblot; Mittelwerte ± SD, n=7-8, multiple *t*-Tests, P-Wert korrigiert für multiples Testen nach der Holm-Sidak-Methode, **** $P < 0,0001$.

Die Versuche haben gezeigt, dass die Unterdrückung der Bildung von Pentameren, an denen PLN-R9C beteiligt ist, zu einer stärkeren Phosphorylierung von endogenem PLN führt. Die Ergebnisse deuten ferner darauf hin, dass die verstärkte Phosphorylierung von PLN-R9C in Heteropentameren eine wichtige Rolle für die durch PLN-R9C verursachte verringerte Phosphorylierung von endogenem PLN spielt und damit auch für die verstärkte inhibitorische

Wirkung auf die SERCA2a und die Lebenszeitverkürzung durch die R9C-Mutation verantwortlich sein könnte.

3.3 Die Rolle von Phospholamban in der Entstehung kardialer Dysfunktion im *remote* Myokard in der Frühphase nach Myokardinfarkt

3.3.1 Untersuchung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs in isolierten Kardiomyozyten des *remote* Myokards 24 Stunden nach einstündiger Ischämie

Nach Myokardinfarkt (MI) ist der ischämische Teil des Herzens infolge Zelluntergangs, verringerter Kontraktilität und Umbauprozessen im Myokard (*remodeling*) in seiner Funktion eingeschränkt. Darüber hinaus unterliegt auch der nicht-ischämische Teil (*remote* Myokard, RM) Veränderungen, welche schließlich zur Funktionseinschränkung führen und die gesamte Herzleistung negativ beeinflussen. Die zu Grunde liegenden molekularen Ursachen im RM sind hierbei weitgehend ungeklärt. Im Folgenden sollte zunächst die Hypothese überprüft werden, ob Veränderungen der kardiomyozytären Kalziumströme für die Einschränkung der Kontraktilität verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grund wurde der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf in isolierten Kardiomyozyten 24 Stunden nach einstündiger Ischämie untersucht (Messungen durchgeführt und ausgewertet von Annette Kronenbitter, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf). Die Zellen wurden entweder aus dem RM oder aus dem entsprechenden Gewebeteil scheinoperierter Tiere isoliert (Kontrolle). Im RM zeigte sich eine signifikante Reduktion der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination, der Höhe der Kalziumtransienten sowie der Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung aus dem SR (Abbildung 27). Die Stimulation der Zellen mit Isoproterenol (10^{-7} M) führte in Kontrolle (K) und RM zu einer signifikanten Steigerung dieser Parameter. Die Zunahme der Geschwindigkeit des kardiomyozytären

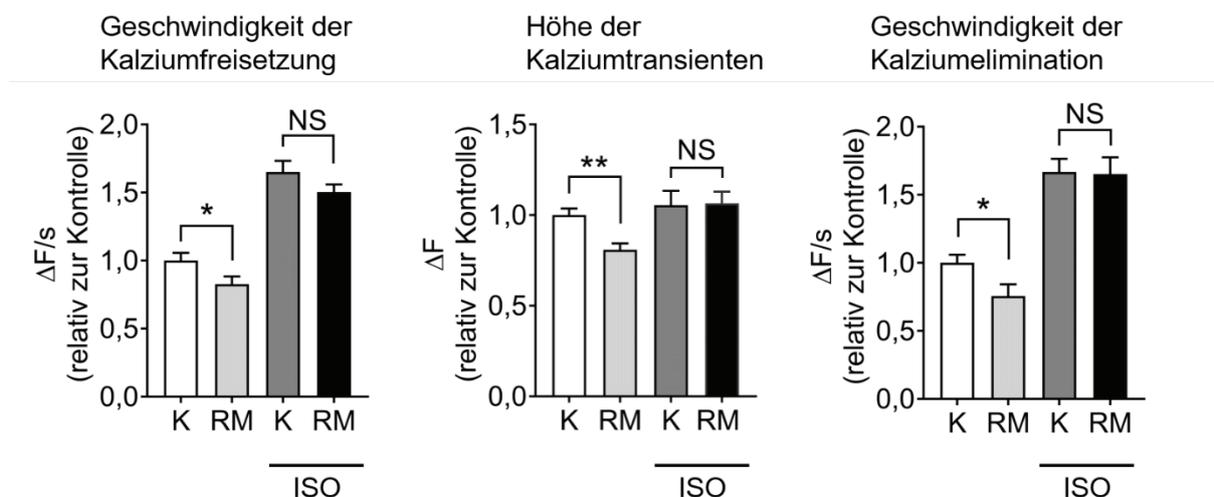


Abbildung 27 Untersuchung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs in isolierten Kardiomyozyten aus dem *remote* Myokard 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. Messungen von Ca^{2+} -Transienten (Fura-2-Methode) in isolierten Kardiomyozyten aus dem RM 24 Stunden nach einstündiger Ischämie bzw. Scheinoperation. Messungen und Datenauswertung durchgeführt von Annette Kronenbitter, Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *remote* Myokard; ISO: Isoproterenol (10^{-7} M); Mittelwerte \pm SEM, NS: nicht signifikant, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Kalziumkreislaufs fiel im RM jedoch größer aus als in der Kontrolle. Sowohl die Amplitude der Kalziumtransienten als auch die Kinetik der Kalziumströme unterschieden sich in Kontrolle und RM nach Stimulation mit Isoproterenol nicht mehr voneinander. Dies legte eine gestörte intrazelluläre β -adrenerge Signalweiterleitung im RM nach Myokardinfarkt nahe, welche durch Applikation eines β -adrenergen Agonisten normalisiert werden kann.

3.3.2 Untersuchung der Expression von Proteinen des SERCA2a-Komplexes im RM nach I/R

Als mögliche molekulare Ursache für die beobachtete Verlangsamung der myozytären Kalziumhomöostase im RM, wurde eine Veränderung der Expression von Schlüsselproteinen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs in Erwägung gezogen. Als erstes wurde die Expression von Proteinen des SERCA2a-Komplexes in Kontrolle und RM mittels *western blot*-Analyse quantifiziert. Die Proteinexpression von SERCA2a zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle (K) und RM (Abbildung 28, oben). Somit beruhte

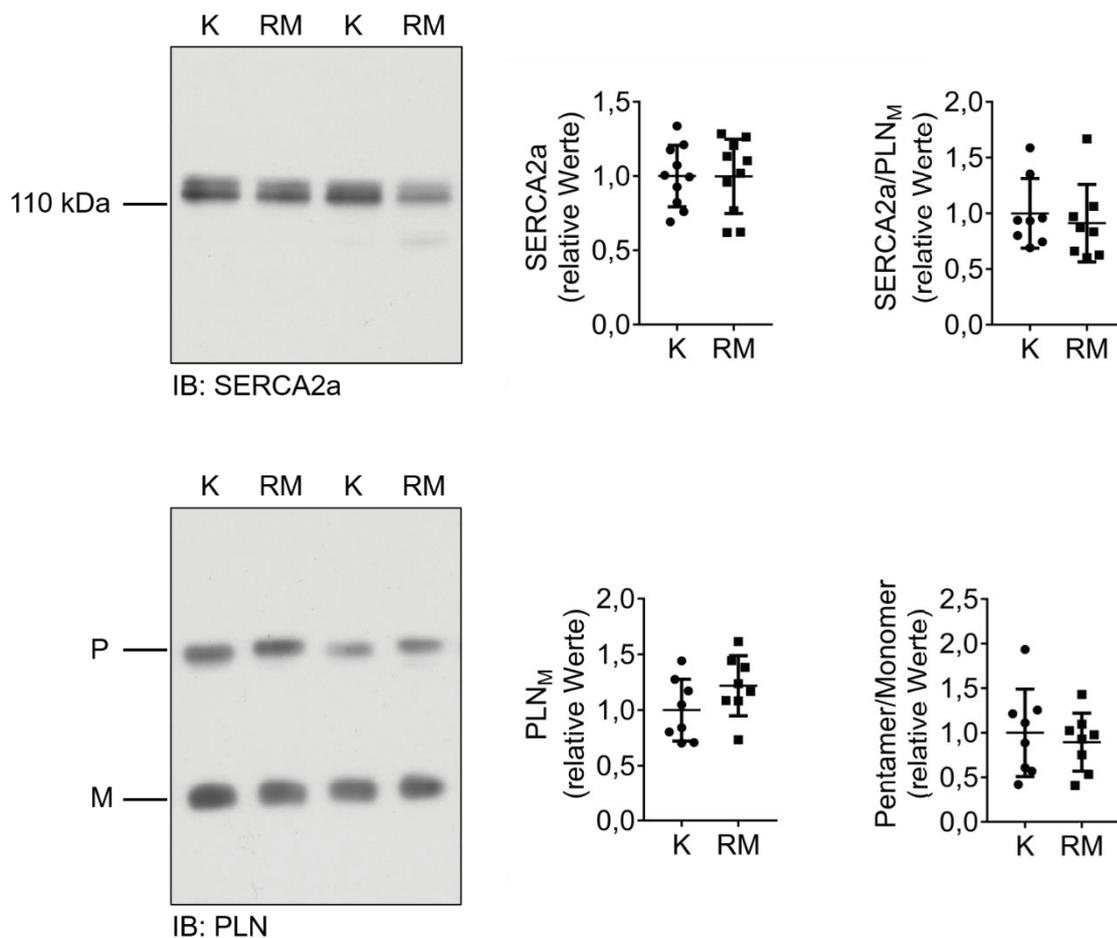


Abbildung 28 Analyse der Proteinexpression von SERCA2a und PLN 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. *Western blot*-Analysen von je zwei repräsentativen Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; P: Pentamer; M: Monomer; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; PLN_M: PLN-Monomere; Mittelwerte \pm SD, n=8-10 Herzen.

die beobachtete Verlangsamung der zytosolischen Kalziumelimination nicht auf einer reduzierten Expression von SERCA2a. Als wichtiger negativer Regulator der SERCA2a-Aktivität wurde die Expression von PLN untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Menge SERCA2a-inhibitorischer PLN-Monomere. Ebenso waren das Verhältnis zwischen SERCA2a und PLN, sowie das Pentamer-/Monomer-Verhältnis von PLN nicht beeinträchtigt (Abbildung 28, unten).

Die Expression von S100A1, einem weiteren an der Regulation der SERCA2a-Aktivität beteiligten Protein (vgl. 1.2.7.2), war im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls unverändert (Abbildung 29).

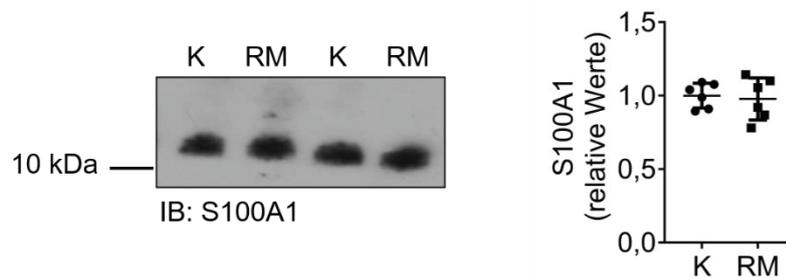


Abbildung 29 Analyse der Proteinexpression des kalziumregulatorischen Proteins S100A1 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. Western blot-Analysen von je zwei repräsentativen Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; Mittelwerte \pm SD, n=6 Herzen.

Des Weiteren zeigte die Proteinexpression des unter 1.2.7.1 beschriebenen PLN-Bindeproteins HAX-1 keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30).

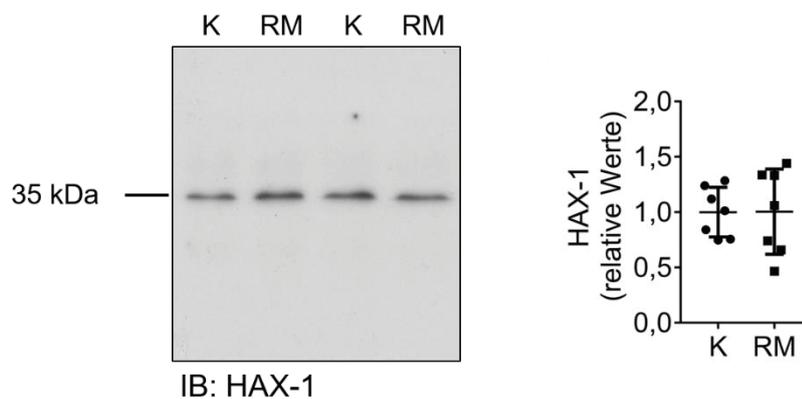


Abbildung 30 Analyse der Proteinexpression von HAX-1 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. Western blot-Analysen von Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *remote* Myokard; Mittelwerte \pm SD, n=7 Herzen.

Da die Expression dieser regulatorischen Schlüsselproteine der kardiomyozytären Kalziumhomöostase zu diesem frühen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt im Vergleich zur Kontrolle unverändert war, wurde eine mögliche Beteiligung posttranslationaler Mechanismen näher untersucht. Zudem legte die Normalisierung von Kinetik und Amplitude der

Kalziumtransienten durch β -adrenerge Stimulation (vgl. 3.3.1) ebenfalls posttranslationale Ursachen für den gestörten Kalziumkreislauf nahe.

3.3.3 PLN-Phosphorylierungszustand an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 im RM nach I/R

Als direktes PKA-Zielprotein mit entscheidender Funktion in der β -adrenergen Regulation der SERCA2a-Aktivität wurde der Phosphorylierungszustand von PLN nach I/R analysiert. Hierbei kommt der Phosphorylierungsstelle S16 besondere Bedeutung zu (vgl. 1.2.3). Im RM zeigte

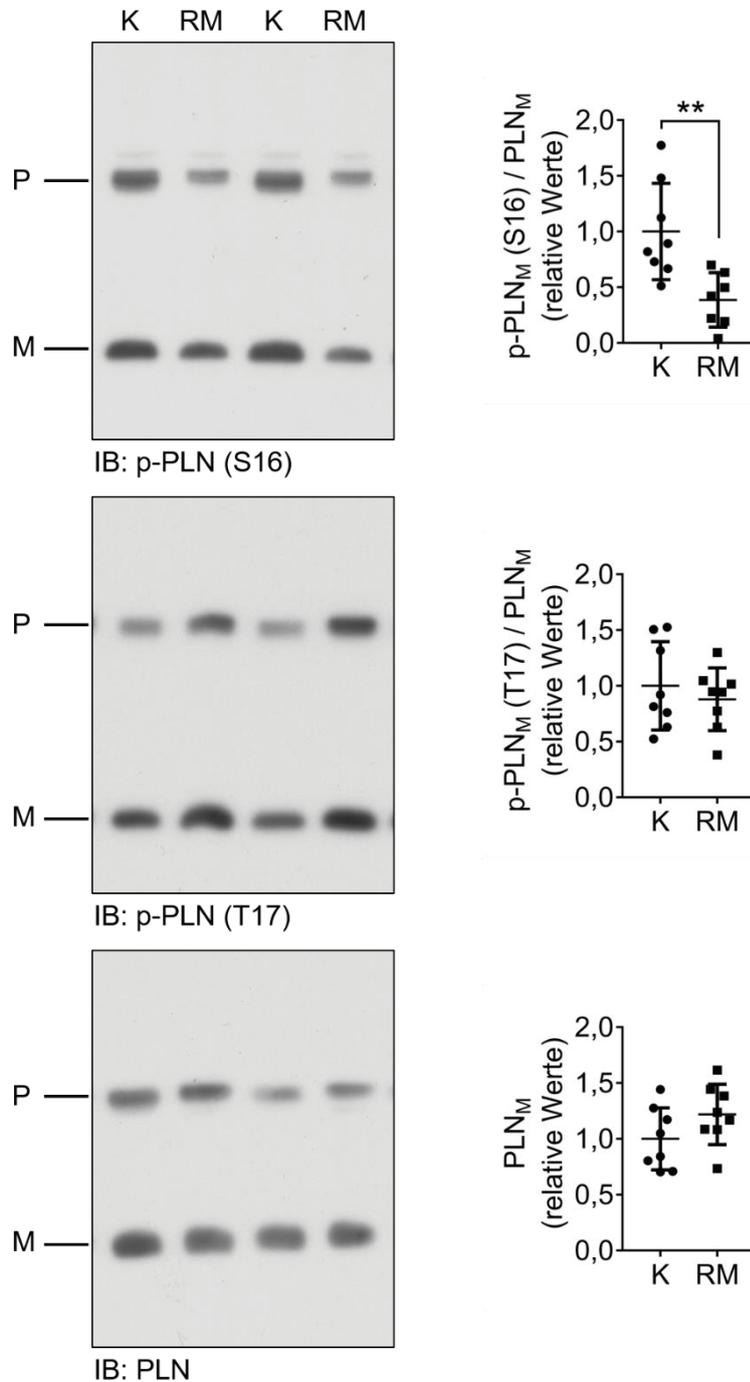


Abbildung 31 Untersuchung des PLN-Phosphorylierungszustands an S16 und T17 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. Western blot-Analysen von je zwei repräsentativen Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; PLN_M: PLN-Monomere; p-PLN_M: Phosphorylierte PLN-Monomere (S16 bzw. T17); Mittelwerte \pm SD, n=8 Herzen, **P<0,01.

sich eine signifikante Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLN-Monomeren an S16 (Abbildung 31, $P < 0,01$). Der Anteil S16-phosphorylierter PLN-Monomere war im RM um etwa 60 % geringer als in der Kontrolle. Die CaMKII-abhängige Phosphorylierung an T17 zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 31).

Unabhängig von phosphospezifischen Antikörpern wurde die Gesamtphosphorylierung von PLN-Monomeren mittels Phos-Tag™ SDS-PAGE analysiert. In Übereinstimmung mit der reduzierten S16 Phosphorylierung zeigte sich ein signifikant reduzierter Anteil von ein- und zweifach phosphorylierten PLN-Monomeren. Die Fraktion der unphosphorylierten, SERCA2a-inhibitorischen Monomere war dagegen im RM signifikant erhöht (Abbildung 32).

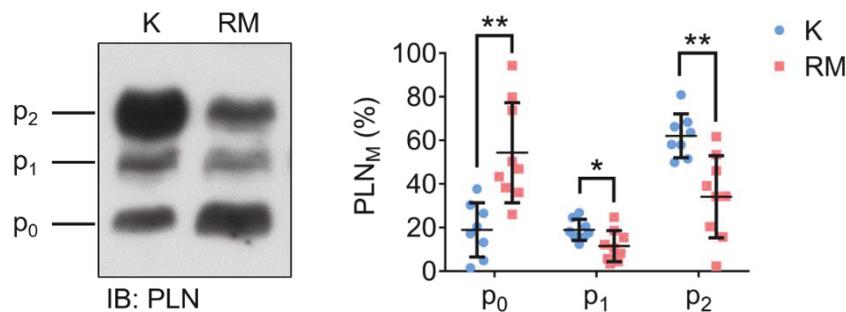


Abbildung 32 Der Anteil nicht phosphorylierter PLN-Monomere ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie signifikant erhöht. Phos-Tag™-Analyse von PLN-Monomeren 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. p₀: unphosphorylierte PLN-Monomere; p₁: einfach phosphorylierte Monomere; p₂: zweifach phosphorylierte Monomere; IB: Immunoblot; Mittelwerte \pm SD, n=8-9 Herzen, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Die im RM verringerte PLN-Phosphorylierung (S16) ließ sich durch β -adrenerge Stimulation vollständig normalisieren (Abbildung 33). In Übereinstimmung damit zeigten auch die Messungen der zytosolischen Kalziumtransienten eine vollständige Normalisierung nach Stimulation (Abbildung 27).

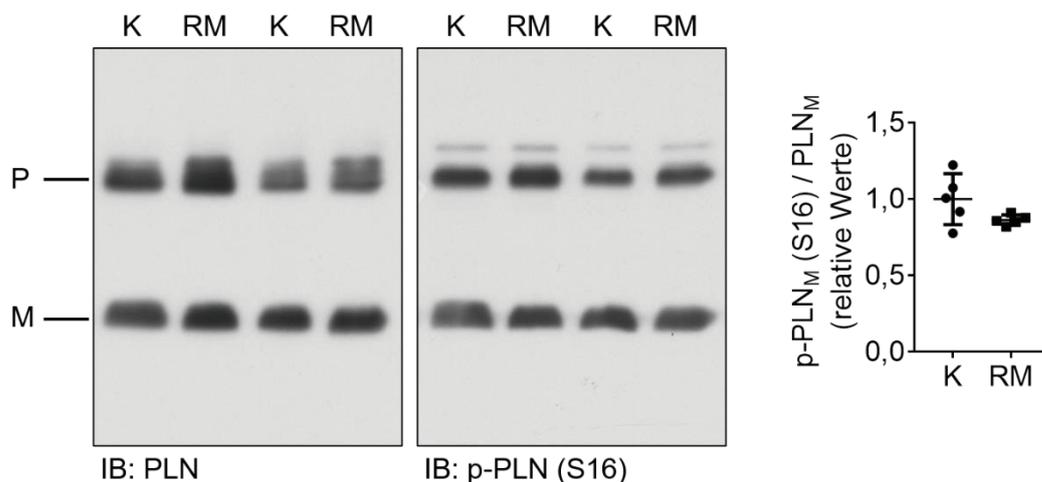


Abbildung 33 Phosphorylierungszustand von PLN (S16) in Kardiomyozyten des RM 24 Stunden nach einstündiger Ischämie nach Stimulation mit Isoproterenol (10^{-7} M). Die basal verringerte PLN-Phosphorylierung an S16 ließ sich durch β -adrenerge Stimulation vollständig normalisieren. P: PLN-Pentamere, M: PLN-Monomere, IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: Remote Myokard; PLN_M: PLN-Monomere; p-PLN_M: Phosphorylierte PLN-Monomere (S16 bzw. T17); Mittelwerte \pm SD, n=5 Kardiomyozytenpräparationen.

Zusammengenommen weisen die Daten eine infolge verminderter S16-Phosphorylierung gesteigerte PLN-Aktivität als Ursache für die reduzierte SERCA2a-Aktivität in der Frühphase nach Myokardinfarkt aus.

3.3.4 Untersuchung der PKA-Aktivität und -Expression im RM nach I/R

Zur Abklärung der Ursache für die reduzierte PLN-Phosphorylierung an S16 wurde die PKA-Proteinexpression mittels *western blot* quantifiziert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Proteinexpression der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA cat α) (Abbildung 34). Darüber hinaus wurde die PKA-Aktivität mittels ELISA gemessen. Die ELISA-Messung wurde von Irmhild Rüter zusammen mit Annette Kronenbitter im Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, durchgeführt. Hierbei wurde die Gesamtaktivität im RM, bzw. dem entsprechenden Gewebeteil der Kontrolle, gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und RM. Eine reduzierte Aktivität oder Proteinexpression der PKA scheint somit nicht ursächlich für die gesteigerte Inhibition von SERCA2a durch PLN verantwortlich zu sein.

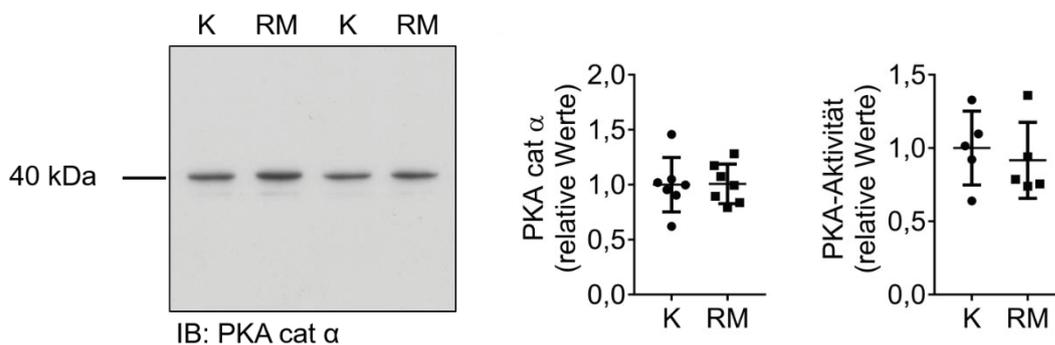


Abbildung 34 Die Aktivität und Proteinexpression der Proteinkinase A ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert. *Western blot*-Analysen und PKA-Aktivitätsmessung mittels ELISA von Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. Die ELISA-Messung der PKA-Aktivität wurde von Irmhild Rüter zusammen mit Annette Kronenbitter im Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, durchgeführt. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; PKA cat α : katalytische Untereinheit der Proteinkinase A; Mittelwerte \pm SD, n=5-7 Herzen.

3.3.5 Untersuchung weiterer Proteine mit PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen im RM nach I/R

Da die Messung der PKA-Gesamtaktivität im Herzgewebe keinen Unterschied zwischen Kontrolle und RM zeigte, wurde eine zellulär oder subzellulär begrenzte, reduzierte PKA-Aktivität als weitere Möglichkeit in Betracht gezogen. Auf Grund dessen wurde die Phosphorylierung weiterer und in der Zelle unterschiedlich lokalisierter Zielproteine der PKA nach Myokardinfarkt untersucht. Die PKA-abhängige Phosphorylierung des im SR in Nähe des SERCA2a-Komplexes lokalisierten RyR2 an S2808 war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (Abbildung 35). An der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle S2814 zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede. Somit konnte die in isolierten Kardiomyozyten gemessene veränderte Geschwindigkeit der Kalzium-Freisetzung nicht auf eine veränderte Phosphorylierung dieser beiden regulatorischen Phosphorylierungsstellen zurückgeführt werden.

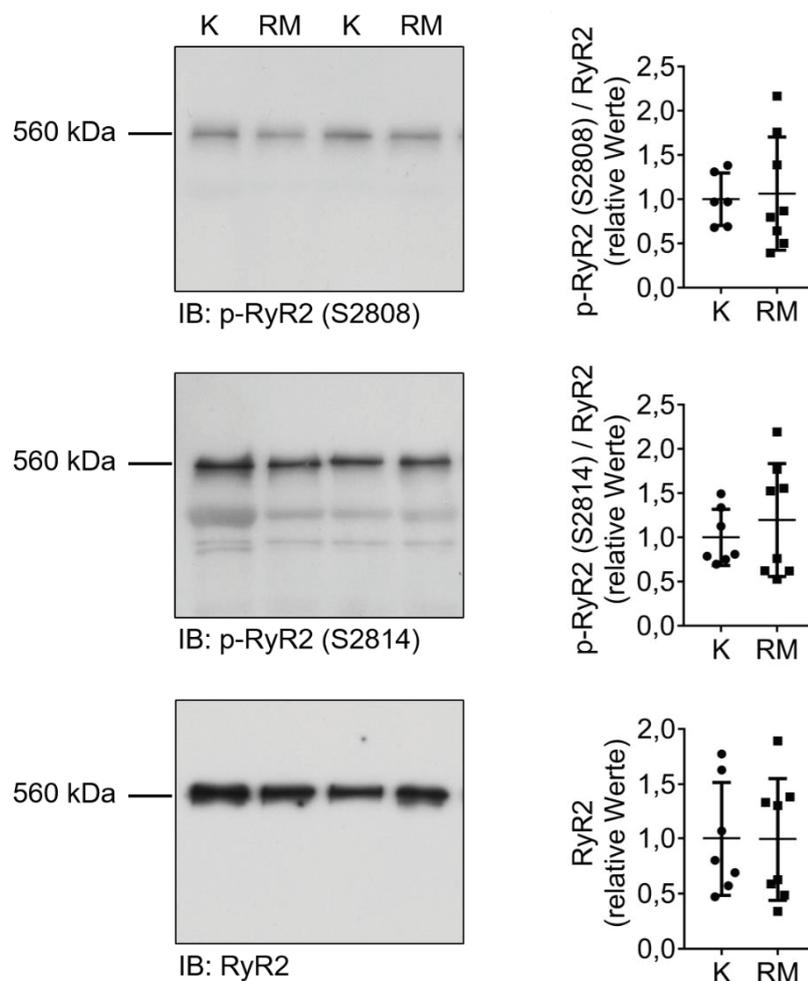


Abbildung 35 Untersuchung des Phosphorylierungszustands von RyR2 24 Stunden nach einstündiger Ischämie. Western blot-Analysen von Membranpräparationen aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; RyR2: Ryanodinrezeptor-2; p-RyR2: phosphorylierter RyR2 (S2808 bzw. S2814); Mittelwerte \pm SD, n=6-8 Herzen.

Als SR-unabhängiges PKA-Zielprotein wurde das Sarkomerprotein Troponin I (cTnI) untersucht. Die PKA-abhängige Phosphorylierung von cTnI an S23/24 war zwischen Kontrolle und RM nicht signifikant voneinander verschieden (Abbildung 36). Zusammengenommen legen die Daten keine subzellulär begrenzte, reduzierte PKA-Aktivität als Ursache für die reduzierte PLN-Phosphorylierung nahe.

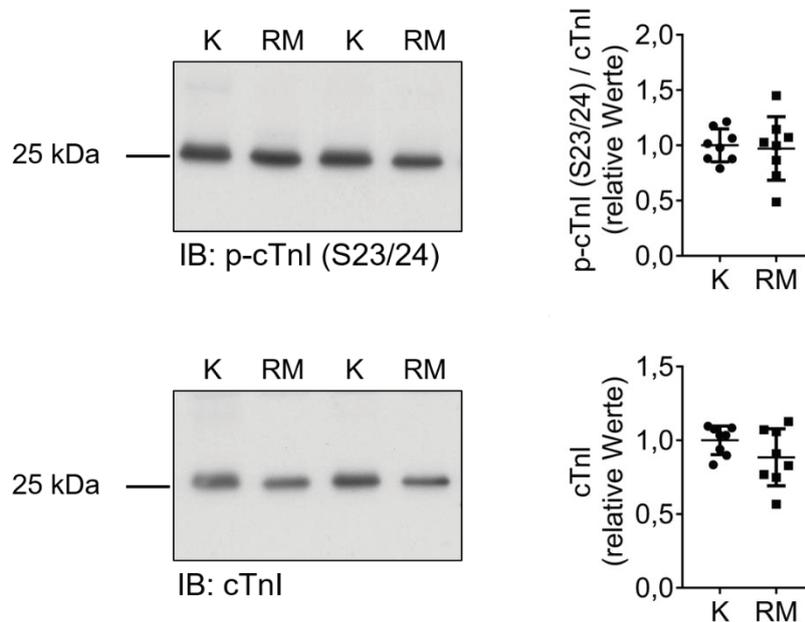


Abbildung 36 Die PKA-abhängige Phosphorylierung von kardialem Troponin-I ist 24 Stunden nach einstuändiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert. *Western blot*-Analysen von Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; cTnI: kardiales Troponin-I; p-cTnI: phosphoryliertes kardiales Troponin-I (S23/24); Mittelwerte \pm SD, n=8 Herzen.

3.3.6 Untersuchung der Proteinexpression von Proteinphosphatase 1 (PP1) und Inhibitor-1 (I-1) im RM nach I/R

Auf Grund der vorangegangenen Befunde stellte sich die Frage, inwiefern Proteinphosphatasen für die reduzierte Phosphorylierung von PLN und in der Folge für die verstärkte SERCA2a Inhibition verantwortlich sein könnten. Die Proteinphosphatase 1 (PP1) ist für etwa 70 % der PLN-Dephosphorylierung verantwortlich²³. Daher wurde eine Steigerung der Proteinexpression dieser Phosphatase nach Myokardinfarkt als Ursache für die beobachtete Verminderung der PLN Phosphorylierung in Betracht gezogen. *Western blot*-Analysen zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Veränderung der Proteinexpression von PP1 (Abbildung 37). Die PP1-Aktivität wird auf komplexe Art und Weise durch eine Vielzahl an regulatorischen Untereinheiten reguliert. Inhibitor-1 (I-1) ist eine gut charakterisierte Untereinheit, für welche bereits eine Rolle in der chronischen Herzinsuffizienz gezeigt werden konnte⁹⁷. Aus diesem Grund wurde die Proteinexpression dieser Untereinheit analysiert. Es konnte keine signifikante Veränderung der Proteinexpression von I-1 nach Myokardinfarkt

festgestellt werden (Abbildung 37). Änderungen der Proteinmengen von PP1 und I-1 scheinen demnach nicht ursächlich an der reduzierten PLN-Phosphorylierung beteiligt zu sein.

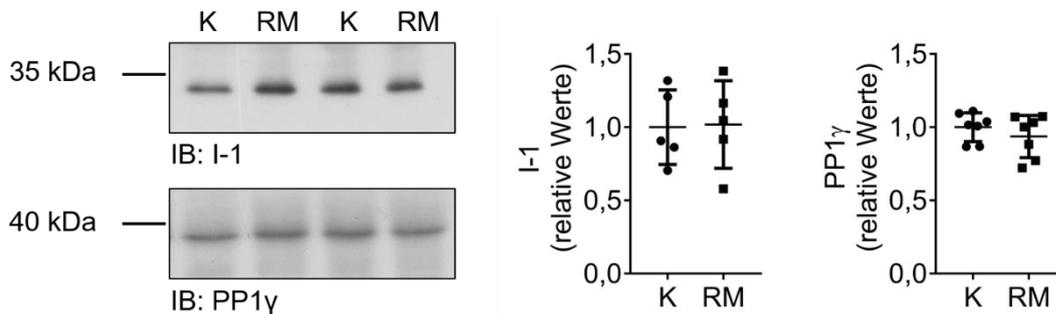


Abbildung 37 Die Proteinexpression von Proteinphosphatase-1 und Inhibitor-1 ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Western blot-Analysen von Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard bzw. dem entsprechenden Gewebeteil von scheinoperierten Kontrollmäusen. IB: Immunoblot; K: Kontrolle (scheinoperiert); RM: *Remote* Myokard; PP1 γ : Proteinphosphatase-1 γ ; I-1: Inhibitor-1; Mittelwerte \pm SD, n=5-7 Herzen.

3.3.7 Untersuchung der Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A im RM nach I/R

Bedingt durch das komplexe Netzwerk an Regulatoren der Proteinphosphatase-Aktivität, wurde diese im Folgenden direkt untersucht. Hierzu wurde die Aktivität der Protein Phosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) gemessen. Zusammen sind diese in Kardiomyozyten für über 95 % der PLN-Dephosphorylierung verantwortlich²³. Die Messungen erfolgten im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster in Kooperation mit PD Dr. P. Boknik. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach Anleitung gemeinsam mit PD Dr. P. Boknik. Nach MI zeigte sich in den Herzbasen eine signifikant erhöhte Gesamtaktivität der beiden Phosphatasen ($P < 0,05$). Zur Bestimmung der PP2A-Aktivität wurden 3 nM Okadasäure eingesetzt. Zur Unterscheidung des Anteils von PP1- und PP2A-Aktivität an der Gesamtaktivität wurden 3 nM Okadasäure eingesetzt. In dieser Konzentration inhibiert Okadasäure PP2A, jedoch nicht PP1. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität von PP2A (Abbildung 38, Basis, $P < 0,01$). Die PP1-Aktivität war nicht signifikant erhöht, zeigte jedoch eine Tendenz hin zu gesteigerter Aktivität.

Zum Vergleich wurde die Phosphatase-Aktivität auch im infarzierten Teil bzw. dem entsprechenden Gewebeteil der scheinoperierten Kontrollmäuse untersucht (Abbildung 38, Apex). Im Gegensatz zu den Herzbasen zeigten die Aktivitäten von PP1 und PP2A hier keine signifikanten Unterschiede.

Zusammengenommen legen die Daten nahe, dass erhöhte PP1/PP2A-Aktivität für die beobachtete Verminderung der basalen PLN-Phosphorylierung im RM von kausaler Bedeutung ist. Die Folge ist eine gesteigerte SERCA2a-Inhibition, was sich in einer Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit von Kardiomyozyten des RM nach I/R niederschlägt. Ferner kann die verringerte Kalziumbeladung des SR für die reduzierte Kalziumfreisetzung vor jeder

Myozytenkontraktion eine ursächliche Rolle spielen. Die auf diese Weise gestörte Funktion des RM trägt zur Einschränkung der Leistungsfähigkeit des Herzens in der Frühphase nach Infarkt bei⁹⁸.

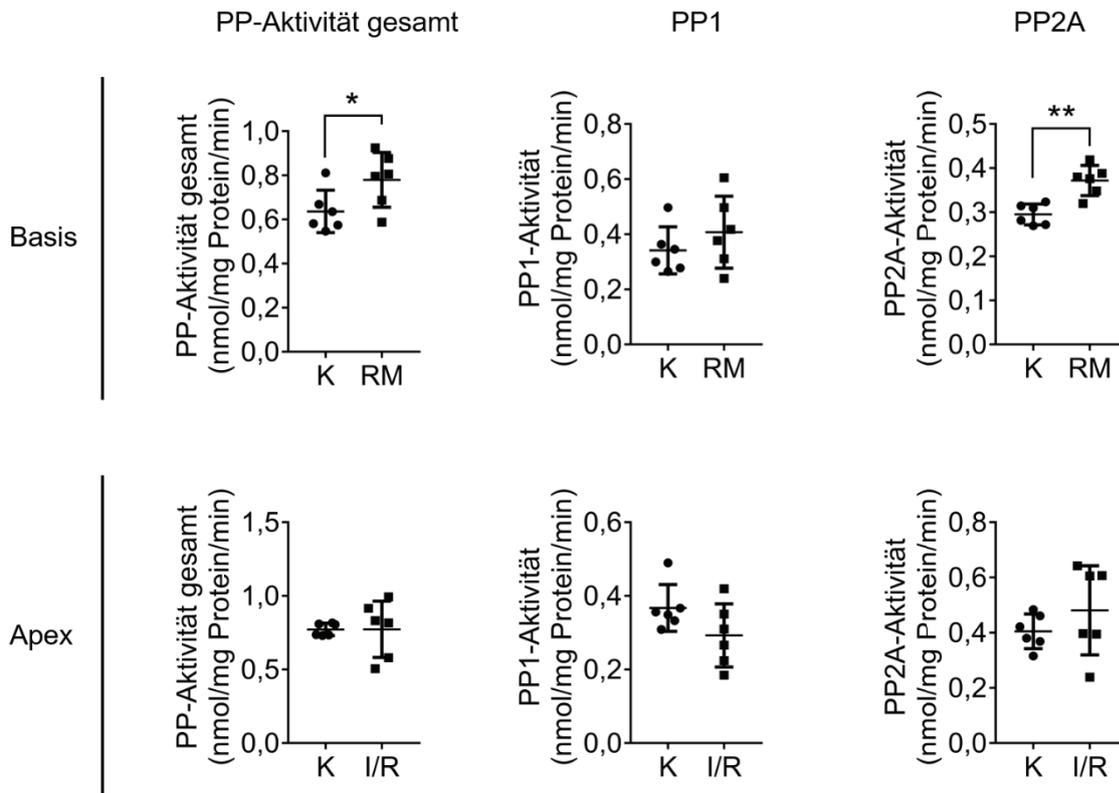


Abbildung 38 Die Aktivität der Proteinphosphatase 2A im RM ist 24 Stunden nach einstündiger Ischämie signifikant erhöht. Messung der Aktivitäten der Proteinphosphatasen 1 und 2A in Herzgewebe-Lysaten aus dem *remote* Myokard (Basis) und infarzierter Herzspitze (Apex), bzw. den entsprechenden Gewebeteilen scheinoperierter Kontrollmäuse. Als Substrat wurde [³²P]Phosphorylase a verwendet. Die Messungen erfolgten im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster in Kooperation mit PD Dr. P. Boknik. Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach Anleitung gemeinsam mit PD Dr. P. Boknik. K: Kontrolle (scheinoperiert); I/R: Ischämie/Reperfusion; Mittelwerte \pm SD, n=6 Herzen, *P<0,05; **P<0,01.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von PLN-Pentameren in der Regulation der SERCA2a-Aktivität

Die Kalzium-ATPase SERCA2a ist ein zentraler Regulator der kardiomyozytären Kalziumhomöostase. Da Kalzium in vielfältige zelluläre Funktionen involviert ist, können Störungen der SERCA2a-Funktion dramatische Folgen für das Herz und den gesamten Organismus haben, wie nicht zuletzt durch die embryonale Letalität SERCA2-defizienter Mäuse dokumentiert⁹⁹.

Kalzium stellt ein wichtiges Signal zur Steuerung zahlreicher zellulärer Prozesse dar. So ist Kalzium an der Regulation des Energiehaushalts, der Genexpression und der Aktivität sowie des Aufbaus von Proteinen bzw. Proteinkomplexen beteiligt¹⁰. Darüber hinaus werden kalziumvermittelte Signale auch in andere Signalwege integriert. So bewirkt eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration eine Aktivierung von CaMKII, einer Kinase, die eine Reihe von Zielproteinen phosphoryliert. Nicht zuletzt vermittelt Kalzium in Herzmuskelzellen die Kontraktion und Relaxation der Sarkomere. Deshalb wirken sich Veränderungen der SERCA2a-Aktivität unmittelbar auf die Pumpfunktion des Herzens aus (Vgl. 1.1).

Im Herzmuskel von Patienten mit Herzinsuffizienz ist die Proteinexpression von SERCA2a regelmäßig reduziert^{6,10,100–103}. Lange Zeit war unklar, ob dies eine Folge der Herzinsuffizienz ist oder auch kausal zur Entwicklung der kontraktiven Fehlfunktion beiträgt. Mit der Identifikation angeborener PLN-Mutationen in Familien mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich jedoch, dass Veränderungen der SERCA2a-Aktivität sogar alleinige Ursache für schwerwiegendes und letztlich letales morphologisches und funktionelles kardiales *remodeling* darstellen können^{54,55,104}. Ein tieferes Verständnis der Regulation der SERCA2a-Aktivität im Herzen ist daher sowohl wissenschaftlich als auch klinisch von hoher Relevanz, um die Pathomechanismen der Herzinsuffizienz besser zu verstehen und möglicherweise neue Ansatzpunkte für kausale Therapiestrategien zu identifizieren.

Der wichtigste Regulator der SERCA2a-Aktivität ist PLN. Aus diesem Grund besitzt auch die Regulation der PLN-Aktivität großen Stellenwert für die Pathogenese der Herzinsuffizienz. Die vorliegende Arbeit hat zum ersten Mal gezeigt, dass PLN im Herzen nicht nur in monomerer Form durch direkte Interaktion mit SERCA2a die Kalzium-ATPase hemmt, sondern dass auch Pentamere des PLN die SERCA2a-Aktivität und damit den kardiomyozytären Kalziumkreislauf modulieren. Unter basalen Bedingungen verstärkten PLN-Pentamere die inhibitorische Aktivität der Monomere, indem sie den Phosphorylierungszustand der PLN-Monomere an deren PKA-abhängiger Phosphorylierungsstelle (S16) reduzierten. Die Folge der verstärkten Hemmung von SERCA2a war eine verlangsamte Kalziumelimination aus dem Zytosol der Herzmuskelzellen.

Die Rolle von PLN-Monomeren als SERCA2a-inhibitorische PLN-Fraktion ist gut etabliert. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass verschiedene PLN-Mutanten, welche die Pentamerbildung unterdrücken, SERCA2a stärker inhibieren als Wildtyp-PLN³². Mäuse, welche die überwiegend monomeren PLN-Mutanten L37A und I40A herzspezifisch überexprimierten, zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp stark verringerte Aktivität von SERCA2a⁴³. Darüber hinaus konnte für Monomere die Bindestelle im SERCA2a-Protein identifiziert werden, welche sich nahe der Kalziumbindestelle befindet. PLN-Monomere binden SERCA2a dabei in der E2-Konformation (Vgl. 1.2.1), was die Bindung von Kalziumionen verhindert⁴⁶. Dies macht eine Rolle für Monomere als inhibitorische Fraktion auch mechanistisch plausibel.

Die funktionelle Rolle der Pentamerbildung von PLN ist dagegen weniger gut definiert. Einige Befunde deuten aber darauf hin, dass auch Pentameren eine regulatorische Funktion beikommt. So liegen etwa 70 % des PLN-Proteins als Pentamer vor³⁷. Dieser hohe Grad an Oligomerisierung lässt vermuten, dass es sich bei Pentameren nicht um eine rein passiv agierende, inaktive PLN-Fraktion handelt. Außerdem konnte eine Bindestelle für PLN-Pentamere im SERCA2a-Protein identifiziert werden, welche sich von der Bindestelle der Monomere unterscheidet⁴⁶⁻⁴⁸. Diese spezifische Interaktion von PLN-Pentameren mit SERCA2a deutet ebenfalls auf eine funktionelle Relevanz der Pentamerbildung hin. Des Weiteren zeigen Befunde von Chu *et al.*⁵³, dass Pentamere die PLN-vermittelte SERCA2a-Inhibition in einem Mausmodell verstärkten. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde hierbei jedoch nicht aufgeklärt. Zusammenfassend sind die funktionellen Konsequenzen der PLN-Pentamerisierung nicht vollends verstanden.

Bisher wurde ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Pentameren und Monomeren diskutiert. Die vorgeschlagene Rolle für PLN-Pentamere besteht dabei in einer Speicherfunktion für inaktive PLN-Monomere. Grundlage dafür war die Beobachtung einer Veränderung des Pentamer-/Monomergleichgewichts in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands an S16^{37,51}. Dabei bildete PLN bei erhöhter S16-Phosphorylierung verstärkt Pentamere. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit in dem verwendeten Mausmodell TgPLN keine Verschiebung des Pentamer-/Monomergleichgewichts durch Veränderungen des Phosphorylierungszustands an S16 beobachtet werden (3.1.4, Abbildung 11). Die Gründe für diese Diskrepanz liegen möglicherweise in der verwendeten Analyseverfahren. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der Herzgewebe mittels *western blot* analysiert wurde, wurden die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an rekombinanten, aufgereinigten Proteinen in artifiziellen Membranumgebungen mittels spektroskopischer Methoden durchgeführt. Dabei wurde von der Interaktion der Lipide mit PLN auf den Oligomerisierungsgrad geschlossen. Neben diesen Befunden konnte zu einem späteren Zeitpunkt von Robia *et al.* gezeigt werden, dass der

Austausch von Protomeren eines Pentamers gegen ein Monomer nur langsam innerhalb von Minuten vorstatten geht¹⁰⁵. Auch dies könnte ein Grund für das in der vorliegenden Arbeit beobachtete unveränderte Pentamer-/Monomergleichgewicht nach Phosphorylierung sein. Der Untersuchungszeitpunkt lag bei drei Minuten nach der β -adrenergen Stimulation, eine Zeitspanne, die möglicherweise zu kurz ist, um Veränderungen des Gleichgewichts zu detektieren. Eine Reaktion auf β -adrenerge Stimulation („*fight-or-flight*“-Reaktion) erfolgt jedoch innerhalb von Sekunden, weshalb diese langsame Kinetik des Austauschs von Protomeren nicht mit der schnell stattfindenden *fight-or-flight*-Reaktion vereinbar ist. Eine reine Speicherfunktion für Pentamere erscheint daher zumindest bei akuter Stimulation wenig plausibel.

Darüber hinaus wurde *in vitro* gezeigt, dass PLN-Pentamere die Kalziumpermeabilität von Membranen steigern können¹⁰⁶. Physiologisch scheint eine Rolle als Kalziumkanal aber nicht relevant zu sein, da die Steigerung der Kalziumpermeabilität nur unter unphysiologisch hohen Membranpotentialen beobachtet werden konnte¹⁰⁷. Im Einklang damit geben auch die vorliegenden Daten dieser Arbeit keinen Hinweis auf einen vermehrten Kalziumausstrom aus dem SR in der Anwesenheit von Pentameren. Eine funktionelle Rolle für Pentamere als Kalziumkanal erscheint daher unwahrscheinlich.

Die Beobachtung, dass PLN-Monomere die SERCA2a-inhibitorische PLN-Fraktion darstellen, legt die Erwartung nahe, dass eine erhöhte Menge an Monomeren zu einer gesteigerten SERCA2a-Inhibition führt. Im Einklang mit dieser Modellvorstellung fanden Zvaritch *et al.* eine verlangsamte zytosolische Kalziumelimination in zwei transgenen Mausmodellen, welche überwiegend monomeres PLN kardiomyozytenspezifisch exprimierten⁴³. Im Gegensatz dazu war die zytosolische Kalziumelimination in der Mauslinie TgAFA, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, beschleunigt. Der Hauptgrund für diese Diskrepanz liegt vermutlich in den verwendeten Mausmodellen. Ein geeignetes transgenes Tiermodell zur Untersuchung der funktionellen Rolle der PLN-Oligomerisierung sollte idealerweise folgende Anforderungen erfüllen: (1) Die Transgenexpression sollte in PLN-defizienten Tieren erfolgen, damit keinerlei endogene Pentamere vorliegen. (2) Die Expression des Transgens sollte zudem ungefähr im physiologischen Bereich liegen. (3) Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten sollte das Transgen die gleiche inhibitorische Kapazität wie Wildtyp-PLN besitzen, d. h. die Mutationen, die zur Unterdrückung der Oligomerisierung führen, sollten *per se* keinen Einfluss auf die Inhibition von SERCA2a besitzen. (4) Die verwendete PLN-Mutante sollte einen möglichst geringen Restanteil an Pentameren besitzen und gut charakterisiert sein. Die von Zvaritch *et al.* verwendeten Mausmodelle exprimierten das endogene PLN-Gen. Somit lagen in diesen Modellen PLN-Pentamere vor. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete transgene Mauslinie TgAFA war hingegen defizient für das endogene PLN-Gen und besaß dadurch keine endogenen PLN-Pentamere. Zudem war die Transgenexpression in den von Zvaritch *et al.*

verwendeten Mausmodellen etwa 11-13-fach stärker als die Expression des endogenen PLN-Gens und somit unphysiologisch hoch. Da in Wildtyp-Mäusen nur etwa 40 % der SERCA2a durch PLN reguliert werden¹⁰⁸, beruht die von Zvaritch *et al.* beobachtete verstärkte SERCA2a-Inhibition möglicherweise unabhängig von der Fähigkeit zur Oligomerisierung auf einer Absättigung von SERCA2a mit PLN-Molekülen. Die Proteinexpression des PLN-AFA-Transgens in der Mauslinie TgAFA war hingegen mit der PLN-Expression wildtypischer Mäuse vergleichbar (3.1.1, Abbildung 8). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die drei Cysteine C36, C41 und C46, welche in PLN-AFA mutiert sind, nicht für die Inhibition von SERCA2a notwendig sind und die Mutation dieser Aminosäuren zur vollständigen Unterdrückung der Pentamerbildung führt⁴¹. PLN-AFA gilt daher als vollständig funktionaler, jedoch pentamerdefizienter Inhibitor von SERCA2a⁴². Die von Zvaritch *et al.* verwendete I40A-Mutation unterdrückt die Pentamerbildung dagegen nicht vollständig³⁵ und ist dadurch zur Untersuchung einer funktionellen Rolle der Pentamerisierung wenig geeignet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Mauslinie TgAFA stellt aus diesen Gründen ein geeigneteres Modell zur Untersuchung der Funktion der PLN-Pentamerisierung dar.

Im Vergleich zur Mauslinie TgPLN zeigten PLN-Monomere der pentamerdefizienten Mauslinie TgAFA eine verstärkte Phosphorylierung an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16, während die CaMKII-abhängige Phosphorylierungsstelle T17 von der Abwesenheit der Pentamere unbeeinflusst war. Mechanistisch kommen hierbei zwei Möglichkeiten in Frage, welche diese Befunde erklären könnten:

Einerseits könnte in Folge der fehlenden Pentamerbildung eine verstärkte PKA-abhängige Phosphorylierung von Monomeren durch PKA stattfinden. Dabei könnte PKA im Gegensatz zur CaMKII möglicherweise eine höhere Affinität zu Pentameren als zu Monomeren besitzen, sodass Pentamere bevorzugt phosphoryliert werden und die Phosphorylierung der Monomere deshalb in Anwesenheit von Pentameren sinkt. In Übereinstimmung damit zeigten Pentamere in einem Zellkulturmodell einen Einfluss auf die S16-Phosphorylierung von Monomeren⁹¹. Dabei war die Kinetik der Phosphorylierung von Pentameren schneller als die der Monomere, was Pentamere als bevorzugte PKA-Zielstruktur nahelegt. Zudem zeigte sich auch in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodell TgPLN eine im Vergleich zu Monomeren verstärkte Phosphorylierung der Pentamere (3.1.3, Abbildung 10).

Andererseits könnte die Dephosphorylierung der Phosphorylierungsstelle S16 durch Phosphatasen in der Abwesenheit von Pentameren vermindert sein. Die Phosphatasen PP1 und PP2A, welche in Kardiomyozyten den Großteil der PLN-Dephosphorylierung vermitteln, dephosphorylieren sowohl S16 als auch T17¹⁰⁹. PP1 und PP2A werden durch eine Vielzahl regulatorischer Untereinheiten reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante der inhibitorischen Untereinheit I-2 zu einer erhöhten Phosphorylierung an S16, jedoch nicht an T17 führte¹¹⁰. Da PLN jedoch nicht direkt mit I-2

interagiert, erscheint es wenig wahrscheinlich, dass die Aktivität von I-2 durch die Oligomerisierung von PLN beeinflusst wird.

Zusammengenommen deuten die Befunde eher auf eine Veränderung der PKA-PLN-Interaktion in Abhängigkeit vom Grad der Oligomerisierung hin, wodurch es zu einem spezifischen Effekt auf die PLN-Phosphorylierung an S16 kommt.

Eine veränderte Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN und PKA wird ferner durch die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit gestützt, dass der Effekt auf die PLN-Phosphorylierung nicht auf einer generell gesteigerten PKA-Aktivität beruhte und spezifisch PLN betraf. So waren die Phosphorylierungszustände der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstellen S23/24 von cTnI unabhängig von der Anwesenheit von Pentameren. Da cTnI ein SR-unabhängiges Protein darstellt, deutet dieser Befund zudem darauf hin, dass Pentamere PKA-Signale an der SR-Membran, jedoch nicht in allen Zellkompartimenten beeinflussen. Darüber hinaus zeigte sich kein Unterschied im Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S2808 von RyR2. Dieses Protein befindet sich in räumlicher Nähe zu SERCA2a ebenfalls in der SR-Membran. Pentamere scheinen die β -adrenerge Signalweiterleitung somit lokal begrenzt zu modulieren und durch die Modulation des Phosphorylierungszustands von Monomeren einen spezifischen Effekt auf SERCA2a zu besitzen. Dies äußerte sich funktionell in einer beschleunigten zytosolischen Kalziumelimination in der Mauslinie TgAFA, in der keine Bildung von Pentameren vorhanden war. Diese Befunde stehen im Einklang mit einem weiteren Mausmodell, welches die überwiegend monomere PLN-Mutante „C41F“ kardiomyozytenspezifisch in PLN-defizientem Hintergrund exprimiert⁵³. Ähnlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell TgAFA war die zytosolische Kalziumelimination hier ebenfalls beschleunigt. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden hier jedoch nicht näher untersucht, sodass geschlossen wurde, dass PLN-Pentamere direkt die SERCA2a-Inhibition vermitteln, was in weiteren Studien jedoch widerlegt werden konnte^{32,44-46}.

Die Daten der vorliegenden Arbeit erweitern das Verständnis der PLN-Regulation dahingehend, dass PLN-Pentamere über eine Modulation des Phosphorylierungszustands von PLN-Monomeren und nicht durch ihre direkte Interaktion die SERCA2a-Aktivität regulieren. Der Einfluss der Pentamere auf den Phosphorylierungszustand der Monomere zeigte sich dabei als abhängig vom Ausmaß der PKA-Aktivierung. Während Pentamere unter Basalbedingungen den Phosphorylierungszustand von Monomeren beeinflussten, ließen sie deren Inaktivierung durch Phosphorylierung nach β -adrenerger Stimulation zu. Dies äußerte sich funktionell in einer Angleichung der Geschwindigkeiten der zytosolischen Kalziumelimination zwischen TgPLN, TgAFA und PLN-defizienten Kardiomyozyten. Dies zeigt, dass die PLN-vermittelte SERCA2a-Inhibition unabhängig vom Grad der Oligomerisierung nach Stimulation vollständig aufgehoben werden kann. Möglicherweise ist

die Affinität der PKA zu Pentameren abhängig vom Phosphorylierungszustand. So könnte die Affinität zu gering phosphorylierten Pentameren höher als zu Monomeren sein, während ab einem gewissen Schwellenwert Monomere bevorzugt phosphoryliert werden. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Pentamere in der vorliegenden Arbeit nach β -adrenerger Stimulation nicht vollständig phosphoryliert vorlagen (3.1.9, Abbildung 16), obwohl die Phosphorylierung der PLN-Monomere unter diesen Bedingungen bereits ihr Maximum erreicht hatte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in dem in Abbildung 39 dargestellten Modell zusammengefasst. Unter basalen Bedingungen ist die inhibitorische Aktivität von Monomeren verstärkt. PLN-Pentamere liegen unter diesen Bedingungen stärker phosphoryliert vor als Monomere. Dies lässt vermuten, dass PLN-Pentamere im Vergleich zu Monomeren basal die bevorzugte PKA-Zielstruktur darstellen. Dadurch verringert sich die basale PKA-abhängige Phosphorylierung der Monomere, sodass deren SERCA2a-inhibitorische Aktivität steigt. Nach β -adrenerger Aktivierung der Zelle ließen Pentamere dennoch eine vollständige Deaktivierung von PLN-Monomeren zu. Der hier vorgeschlagene Mechanismus steht dabei nicht im Widerspruch zur bisherigen Modellvorstellung, nach welcher Monomere SERCA2a inhibieren und Pentamere keine direkten inhibitorischen Eigenschaften besitzen. Gleichzeitig erklären die vorliegenden Daten dieser Arbeit frühere Befunde aus ähnlichen Mausmodellen. Zusammengefasst verstärkt die Fähigkeit zur Pentamerbildung somit die basale PLN-Aktivität und erweitert so den Bereich, in welchem β -adrenerge Regulation von SERCA2a stattfinden kann.

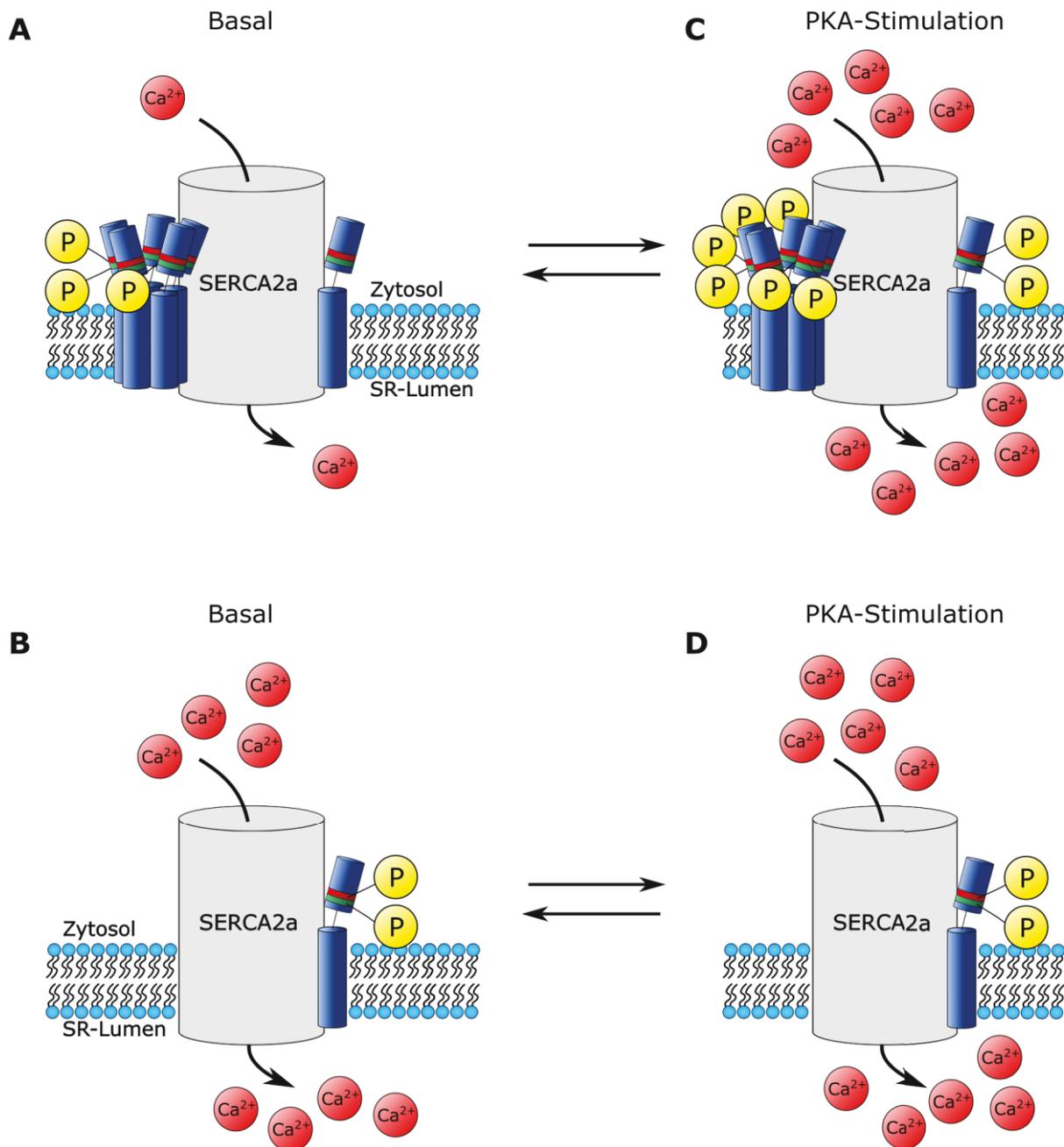


Abbildung 39 Modell der SERCA2a-Regulation durch PLN-Pentamere. (A) Basal liegen Pentamere stärker phosphoryliert vor als Monomere. Die Pentamerbildung führt dabei zu einer Verringerung der Monomerphosphorylierung, sodass eine verstärkte SERCA2a-Inhibition resultiert. (B) In Abwesenheit von Pentameren werden PLN-Monomere bereits basal phosphoryliert, sodass die SERCA2a-Inhibition geringer ausfällt. (C) und (D) Nach Stimulation der PKA werden PLN-Monomere sowohl in Anwesenheit (C) als auch in Abwesenheit (D) von Pentameren phosphoryliert und die SERCA2a dadurch aktiver.

4.2 Die Bedeutung von PLN-Pentameren für die Pathogenese der durch die PLN-Mutation R9C verursachten dilatativen Kardiomyopathie

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um eine PLN-Mutation, R9C, die zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und terminaler Herzinsuffizienz führt. Die Frequenz der Mutation in der Bevölkerung und ihr Anteil an allen DCM-Fällen ist unklar. In den meisten Fällen werden familiäre Fälle der DCM durch Mutationen in Proteinen der Sarkomere oder des Zytoskeletts der Herzmuskelzellen verursacht¹¹¹. Eine in Südafrika durchgeführte Studie untersuchte eine Kohorte von 315 Patienten mit Kardiomyopathien unterschiedlicher Ätiologien, darunter 95 DCM-Patienten, auf Mutationen im PLN-Gen. In dieser Studie wurde als einzige PLN-Mutation die R9C-Mutation gefunden¹¹². Zudem konnte diese Studie zeigen, dass keinerlei Verwandtschaft zur Familie in den USA bestand, in welcher die Mutation zum ersten Mal beschrieben wurde. Die Mutation ist demnach unabhängig davon mindestens ein zweites Mal *de novo* entstanden. Die R9C-Mutation führt zunächst nicht zu klinischen Symptomen, sondern verursacht erst im Alter von etwa 25 Jahren nach und nach eine DCM⁵⁵, sodass Trägern der Mutation die Reproduktion möglich ist. Die Tatsache, dass diese Studie in einer verhältnismäßig geringen Anzahl von DCM-Patienten einmal die R9C-Mutation identifizieren konnte, lässt vermuten, dass die R9C-Mutation möglicherweise eine häufigere Ursache für eine DCM darstellt als zunächst angenommen. Die mechanistische Abklärung der PLN-R9C-vermittelten Pathogenese ist außerdem deshalb von allgemeinem Interesse, weil sie Störungen in der kardiomyozytären Kalziumhomöostase verursacht – ein Phänomen, das regelmäßig bei nahezu allen Formen von Herzinsuffizienz beobachtet wird¹¹³.

Der zugrunde liegende pathogenetische Mechanismus ist bisher nur unvollständig verstanden. Diskutiert wurde bisher eine erhöhte Affinität der PKA zu Heteropentameren aus PLN-R9C und Wildtyp-PLN⁵⁵. In der Folge kommt es zu einer Hypophosphorylierung und damit verstärkten inhibitorischen Aktivität von Wildtyp-PLN-Monomeren. Die resultierende verstärkte SERCA2a-Inhibition wurde als einer der Gründe für die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie vorgeschlagen. Der Phosphorylierungszustand von PLN-R9C und Heteropentameren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals im Mausmodell untersucht und liefert einen tieferen Einblick in den Pathomechanismus dieser Erkrankung.

In vitro konnte gezeigt werden, dass PLN-R9C kaum durch PKA phosphoryliert wird^{54,114}. Es wurde geschlossen, dass die Verhinderung der Phosphorylierung durch die Mutation die Grundlage für eine Hyperinhibition von SERCA2a darstellt. Diese Ergebnisse basieren jedoch auf Versuchen mit aufgereinigten bzw. rekombinanten Proteinen. Die Phosphorylierung erfolgte hier in der Abwesenheit von regulatorischen Untereinheiten der PKA und Wildtyp-PLN in rekonstituierten Proteoliposomen. Bisher wurden jedoch nur heterozygote Träger der R9C-Mutation identifiziert. Vor diesem Hintergrund ist die Relevanz einer isolierten Untersuchung von PLN-R9C für den Pathomechanismus *in vivo* fraglich. Darüber hinaus

konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass PLN-R9C in der Abwesenheit von Wildtyp-PLN nur schwach inhibitorisch auf SERCA2a wirkt⁹⁵. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Phosphorylierung trotz R9C-Mutation in Kardiomyozyten stattfinden kann. Im Einklang mit der von Schmitt *et al.* beobachteten verstärkten Affinität von PKA zu PLN-R9C-enthaltenden Heteropentameren⁵⁵ lag F-R9C in Heteropentameren zudem stärker phosphoryliert vor als F-PLN. Eine stärkere Phosphorylierung und damit Inaktivierung von PLN-R9C trägt möglicherweise auch zu der von Schmitt *et al.*⁹⁵ beobachteten geringeren SERCA2a-Inhibition bei.

Neben der Beeinflussung des Phosphorylierungszustands von Wildtyp-PLN könnte eine verminderte Interaktion von PLN-R9C mit SERCA2a dazu führen, dass Wildtyp-PLN-Protomere aus Pentameren verdrängt werden und somit eine größere Menge SERCA2a-inhibitorischer Monomere zur Verfügung steht. Dies könnte ein Grund für die beobachtete Hyperinhibition von SERCA2a sein. In den Mausmodellen TgF-PLN und TgF-R9C zeigten sich vergleichbare Mengen an Wildtyp-PLN-Monomeren (vgl. 3.2.2, Abbildung 21). Zudem gaben Ko-Immunopräzipitationsversuche in transfizierten HEK293-Zellen keinen Hinweis auf eine veränderte Protein-Protein-Interaktion zwischen PLN-R9C und SERCA2a (vgl. 3.2.3, Abbildung 22). Grund dafür ist vermutlich, dass sich die R9C-Mutation in der zytosolischen Domäne von PLN befindet. Die Interaktion zwischen SERCA2a und PLN findet dagegen in der Transmembrandomäne statt⁴⁹, welche durch die R9C-Mutation nicht beeinflusst zu sein scheint. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Proben vor der Elution reduziert, was zu einer Unterdrückung der disulfidbrückenabhängigen Dimere, sowie weiterer Oligomere führte. Dies stellt eine methodische Limitierung dieser Versuche dar, da die Interaktion von Dimeren und weiteren Oligomeren hier nicht erfasst wurde. Eine Verdrängung von Wildtyp-Protomeren aus Pentameren durch R9C scheint somit nicht für die beschriebene SERCA2a-Hyperinhibition verantwortlich zu sein. Zudem deuten diese Befunde darauf hin, dass die Beeinflussung des Phosphorylierungszustands von Wildtyp-PLN die Hauptursache für die Hyperinhibition von SERCA2a ist.

In der Mauslinie TgF-AFA-R9C ist das Transgen durch die AFA-Mutation nicht an der Bildung von Pentameren beteiligt. Vorarbeiten mit der Mauslinie TgF-AFA-R9C, durchgeführt von Prof. Dr. med. Joachim Schmitt (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf), zeigten eine längere Überlebensspanne im Vergleich zur Mauslinie TgF-R9C (vgl. 3.2.5, Abbildung 25). Dies spricht dafür, dass Heteropentamere für die Pathogenese der durch die R9C-Mutation hervorgerufenen dilatativen Kardiomyopathie von großer Bedeutung sind. Abbildung 40 fasst die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einem Modell zusammen. Die Phosphorylierung der endogenen Wildtyp-PLN-Monomere war in der Mauslinie TgF-AFA-R9C stärker als in TgF-R9C, wo PLN-R9C die Phosphorylierung von PLN im Heteropentamer zu beeinträchtigen scheint. Die stärkere Phosphorylierung von

Heteropentameren scheint somit eine Rolle in der durch PLN-R9C verursachten verringerten Phosphorylierung von Wildtyp-PLN zu spielen. Gleichzeitig zeigen die vorliegenden Daten, dass PLN-R9C ohne die Heteropentamere die Phosphorylierung von PLN nicht beeinträchtigen kann. In der Folge ist die Phosphorylierung von PLN erhöht und wirkt somit der Hyperinhibition entgegen. Da dies die Entwicklung von DCM und Herzinsuffizienz signifikant verzögerte und das Überleben der Mäuse deutlich verlängerte, könnte die Unterbindung der Heteropentamerbildung zwischen Wildtyp-PLN und PLN-R9C die Grundlage für ein Therapieprinzip für betroffene Individuen darstellen.

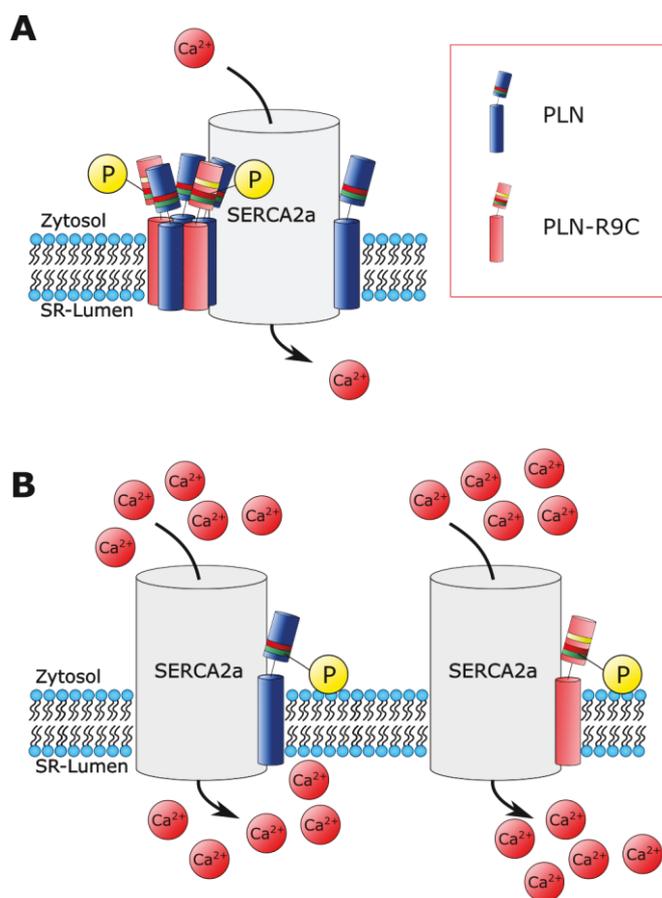


Abbildung 40 Modell der durch PLN-R9C verursachten übermäßigen SERCA2a-Inhibition. (A) In Heteropentameren bestehend aus PLN und PLN-R9C wird PLN-R9C stärker phosphoryliert als PLN. Dadurch kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung von PLN und in der Folge zu einer übermäßigen SERCA2a-Inhibition. (B) PLN-R9C selbst hemmt SERCA2a nur schwach. Ist PLN-R9C nicht an der Heteropentamerbildung mit PLN beteiligt, führt dies zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PLN und einer verringerten SERCA2a-Inhibition.

4.3 Die Rolle von Phospholamban in der Entstehung kardialer Dysfunktion im *remote* Myokard in der Frühphase nach Myokardinfarkt

Ischämische Herzerkrankungen und daraus resultierende Herzinsuffizienz stellen immer noch eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar¹¹⁵. Neben dem infarzierten Bereich ist auch der nicht-infarzierte Bereich (*remote* Myokard, RM) des Herzens funktionell eingeschränkt¹¹⁶. Die Mechanismen, welche zur Funktionseinschränkung des RM führen, sind dabei unvollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein PLN-vermittelter Mechanismus identifiziert, welcher zu einem frühen Zeitpunkt nach I/R zur Verlangsamung der Kardiomyozytenrelaxation im RM beiträgt. Dieser umfasste die Hypophosphorylierung und damit gesteigerte Aktivität von PLN. In der Folge kam es zu einer verstärkten Inhibition von SERCA2a und somit zu einer verlangsamten zytosolischen Kalziumelimination. Der kardiomyozytäre Kalziumkreislauf konnte durch β -adrenerge Stimulation normalisiert werden. Dies bestätigte die verringerte Proteinphosphorylierung als Ursache des verlangsamten Kalziumtransports im RM in der Frühphase nach I/R. Die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A scheinen an der Verlangsamung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs ursächlich beteiligt zu sein, da ihre Aktivität analog zur reduzierten PLN-Phosphorylierung nur im RM erhöht war. Da die Mortalität in Menschen nach Myokardinfarkt insbesondere in den ersten 24 Stunden sehr hoch ist^{89,90}, sind die zugrunde liegenden Mechanismen in diesem Zeitraum von besonderem Interesse. Eine verschlechterte RM-Funktion könnte hier zu einer verringerten Pumpleistung des gesamten Herzens und so zu der hohen Mortalität beitragen.

24 h nach I/R fand sich in der vorliegenden Arbeit in Kardiomyozyten, die aus dem RM isoliert worden waren, ein verlangsamter Kalziumkreislauf (vgl. 3.3.1, Abbildung 27). Die Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung aus dem SR, die Höhe der Kalziumtransienten und die Geschwindigkeit der Kalziumelimination waren verringert. Parallel zum verlangsamten Kalziumkreislauf fand sich eine beeinträchtigte Sarkomerfunktion, sowie eine beeinträchtigte Funktion des RM *in vivo*⁹⁸. Somit trägt der verlangsamte kardiomyozytäre Kalziumkreislauf zur Dysfunktion des RM zu diesem frühen Zeitpunkt nach I/R bei.

Die Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung sowie die Höhe der Kalziumtransienten hängen von der Aktivität von RyR2 ab. Diese ist unter anderem auch abhängig von der Kalziumbeladung des SR, welche wesentlich durch die Aktivität von SERCA2a bestimmt wird¹¹⁷. Somit beeinflusst die Aktivität von SERCA2a indirekt die Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung und die Höhe der Kalziumtransienten. Daneben beeinflusst der Phosphorylierungszustand von RyR2 dessen Kalziumsensitivität und Öffnungswahrscheinlichkeit. Dabei kommt vor allem den Phosphorylierungsstellen S2808 und S2814 Bedeutung bei. PKA phosphoryliert dabei vorwiegend S2808, während CaMKII beide Stellen phosphorylieren kann¹¹⁸. 24 Stunden nach I/R war der Phosphorylierungszustand sowohl der PKA- als auch der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstellen von RyR2

unverändert. Da die Geschwindigkeit der Kalziumfreisetzung und die Höhe der Kalziumtransienten im RM jedoch verringert waren, legt dies nahe, dass die Kalziumbeladung des SR die Ursache hierfür ist. Die Funktion von RyR2 scheint daher eher indirekt beeinträchtigt zu sein und somit nicht ursächlich für die RM-Dysfunktion verantwortlich zu sein. Einer verringerten SERCA2a-Aktivität und damit einhergehenden reduzierten SR-Kalziumbeladung kommt somit eine zentrale Rolle in der RM-Dysfunktion bei.

Verschiedene Mechanismen können einer verlangsamten zytosolischen Kalziumelimination zu Grunde liegen. Eine verlangsamte zytosolische Kalziumelimination durch SERCA2a wurde vor allem im Zuge der Herzinsuffizienz beschrieben. Grund hierfür ist eine Abnahme der SERCA2a-Proteinexpression^{102,103,119}, während die PLN-Proteinexpression unverändert bleibt⁶. Darüber hinaus zeigten einige Studien eine verringerte Phosphorylierung von PLN. Dadurch verringert sich einerseits das SERCA2a/PLN-Verhältnis, andererseits verstärkt die verringerte Phosphorylierung die inhibitorische Aktivität von PLN. Dies führt zur übermäßigen Inhibition von SERCA2a und damit zur Einschränkung der Herzfunktion¹⁰³. Auch im *stunned* Myokard nach I/R findet sich eine reduzierte SERCA2a-Proteinmenge. Die Abnahme beruht auf einer Aktivierung von Calpainen, welche zur Degradation von SERCA2a führen⁷⁷. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle 24 Stunden nach I/R keine Veränderung der Proteinexpression von SERCA2a und PLN im nicht-infarzierten RM. Die verlangsamte zytosolische Kalziumelimination beruhte demnach nicht auf einem veränderten SERCA2a/PLN-Verhältnis oder einer geringeren SERCA2a-Proteinmenge.

Neben PLN regulieren auch die Proteine S100A1 und HAX-1 die Aktivität von SERCA2a. Die Proteinexpression von S100A1 ist eng mit der Kardiomyozytenfunktion assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der S100A1-Proteinexpression kommt^{120,121}. S100A1-defiziente Mäuse entwickeln zudem nach Myokardinfarkt schneller eine Herzinsuffizienz⁶⁸ und weisen eine erhöhte Mortalität auf¹²². S100A1 moduliert unter anderem die Aktivität von SERCA2a und wirkt so direkt auf den kardiomyozytären Kalziumkreislauf⁶⁴. Im RM war die Proteinexpression von S100A1 24 Stunden nach I/R jedoch im Vergleich zur Kontrolle unverändert und scheint somit nicht die Ursache für die verlangsamte zytosolische Kalziumelimination zu sein. Die Interaktion von S100A1 mit weiteren Proteinen erfolgt jedoch kalziumabhängig^{61,62}. Die verringerten zytosolischen Kalziumtransienten könnten dadurch zu einer verringerten Interaktion zwischen S100A1 und SERCA2a führen. Anhand der vorliegenden Daten kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass eine verminderte Interaktion zwischen S100A1 und SERCA2a sekundär zur verringerten SERCA2a-Aktivität beiträgt. HAX-1 verstärkt die SERCA2a-Inhibition durch PLN und ist an der Regulation der SERCA2a-Proteinmenge beteiligt^{57,58}. Dadurch besitzt auch HAX-1 einen unmittelbaren Einfluss auf die Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination und die Kalziumbeladung des SR. Die Proteinexpression

von HAX-1 war im RM ebenfalls unverändert, was gegen eine ursächliche Beteiligung am verlangsamten kardiomyozytären Kalziumkreislauf nach I/R spricht.

Da die Proteinexpression von Schlüsselproteinen des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs im RM unverändert war, sprach dies zu diesem frühen Zeitpunkt nach I/R für eine post-translationale Regulation der beteiligten Proteine. Die SERCA2a-Aktivität wird maßgeblich über den Phosphorylierungszustand von PLN an der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle S16 reguliert¹⁸. 24 Stunden nach I/R fand sich in der vorliegenden Arbeit im RM eine verminderte PLN-Phosphorylierung an S16. Dies entspricht einer im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen gesteigerten SERCA2a-Inhibition durch PLN, welche zur Dysfunktion des RM beitragen könnte. Darüber hinaus konnte die Geschwindigkeit des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs durch β -adrenerge Stimulation normalisiert werden. Parallel dazu fand sich im RM im Vergleich zur Kontrolle nach β -adrenerger Stimulation kein Unterschied mehr bezüglich des S16-Phosphorylierungszustands von PLN. Dies zeigt eine ursächliche Beteiligung der verringerten PLN-Phosphorylierung an S16 an der Verlangsamung des kardiomyozytären Kalziumkreislaufs im RM.

Dagegen war der Phosphorylierungszustand von PLN an der CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstelle nicht verändert. Die CaMKII-Aktivierung erfolgt sekundär in Folge einer PKA-Aktivierung und der damit einhergehenden Erhöhung der Kalziumtransienten. CaMKII bleibt auch nach der Deaktivierung von PKA aktiv und wird daher im allgemeinen für die längerfristige Aufrechterhaltung von β -adrenergen Signalen verantwortlich gemacht¹⁰. Trotz eines verlangsamten kardiomyozytären Kalziumkreislaufs und verringerten systolischen Kalziumkonzentrationen findet sich im RM vermutlich keine reduzierte CaMKII-Aktivität, da zusätzlich zu PLN auch die CaMKII-abhängigen Phosphorylierungsstellen von RyR2 (S2808 und S2814) keine Veränderungen zeigten. Zusammengenommen sprechen die Daten für einen spezifischen Effekt auf die S16-Phosphorylierung von PLN.

Potentiell könnte die verminderte PLN-Phosphorylierung an S16 durch zwei Mechanismen zustande kommen: Einerseits könnte die PKA-Aktivität vermindert sein, andererseits könnte die Signalweiterleitung *downstream* der PKA durch weitere Proteine moduliert werden. Die Proteinexpression und Aktivität von PKA waren im RM im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Zudem zeigen verschiedene Studien, dass es im Zuge des Myokardinfarkts zu einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen, vor allem im Infarktgebiet, kommt^{123–125}. Dies würde sogar eine verstärkte PKA-Aktivität und damit gesteigerte Phosphorylierung von PLN an S16 zur Folge haben. In dem hier verwendeten Mausmodell sind die Katecholaminkonzentrationen nach I/R vermutlich erhöht, da *in vivo*-Studien eine erhöhte Herzfrequenz nach I/R zeigten⁹⁸. Trotz dessen zeigte sich keine verstärkte PKA-abhängige Phosphorylierung verschiedener PKA-Zielproteine. Dies deutet darauf hin, dass adrenerge Signale durch weitere Proteine selektiv moduliert werden.

Die PKA-Aktivität wird unter anderem auch lokal begrenzt in der Zelle reguliert. Hierbei werden durch Phosphodiesterasen (PDEs) lokal begrenzte Mikrodomänen erhöhter cAMP-Konzentrationen geschaffen. In der Folge steigt die PKA-Aktivität in diesen Mikrodomänen an, sodass PKA-Substrate lokal begrenzt phosphoryliert werden. Solche Mikrodomänen erhöhter cAMP-Konzentrationen bestehen zwischen β_1 -Rezeptoren und dem SR¹²⁶. Da der Phosphorylierungszustand der PKA-abhängigen Phosphorylierungsstelle des SR-membranständigen Proteins RyR2 nicht verändert war, spricht dies eher gegen eine lokal veränderte PKA-Aktivität in der Nähe des SR als Ursache für die verringerte PLN-Phosphorylierung. Des Weiteren könnte eine Veränderung der Substratspezifität von PKA ein Grund für die verringerte PLN-Phosphorylierung sein. Diese wird durch *A-kinase anchoring proteins* (AKAPs) vermittelt. Im Falle von PLN kommt die Spezifität durch AKAP18 δ zustande¹²⁷. Zusätzlich dazu vermitteln die beiden großen Spleißvarianten von AKAP18, AKAP18 γ und AKAP18 δ , die Interaktion zwischen PKA und I-1¹²⁸. Eine Verringerung der AKAP18-Proteinexpression würde entsprechend zu einer verringerten PLN-Phosphorylierung an S16 führen. Ebenso wäre eine verringerte T35-Phosphorylierung von I-1 zu erwarten, was dessen inhibitorische Aktivität gegenüber PP1 senken würde. Dadurch könnte die Veränderung der Proteinexpression der beiden großen Spleißvarianten von AKAP18 zur verringerten PLN-Phosphorylierung und zur gesteigerten Proteinphosphataseaktivität (vgl. 3.3.7, Abbildung 38) beitragen. Die Proteinexpression von AKAP18 γ/δ wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, weshalb ein modulierender Einfluss von AKAP18 γ/δ hier nicht vollends ausgeschlossen werden kann.

Neben einer Modulation der Aktivität oder Substratspezifität von PKA werden β -adrenerge Signale auch durch Proteinphosphatasen auf Ebene der PKA-Substrate moduliert. Die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A vermitteln in Kardiomyozyten einen Großteil aller Dephosphorylierungsvorgänge und sind zusammen für etwa 95 % der PLN-Dephosphorylierung verantwortlich²³. PP1 und PP2A scheinen zudem an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt zu sein¹⁰⁹. PP1 und PP2A stellen somit wichtige Regulatoren der Kardiomyozytenfunktion dar. 24 Stunden nach I/R war die Gesamtaktivität von PP1/PP2A und die Aktivität von PP2A im RM signifikant erhöht (vgl. 3.3.7, Abbildung 38). Da sich bezüglich der PKA-Aktivität keine Unterschiede zeigten, lässt dies vermuten, dass die erhöhte Proteinphosphataseaktivität maßgeblich für die reduzierte PLN-Phosphorylierung an S16 verantwortlich ist. Eine Aktivierung von PKA führt darüber hinaus zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von I-1, einer inhibitorischen Untereinheit von PP1⁹⁷. In der Folge kommt es zur Inhibition von PP1, sodass dem PKA-Signal nach β -adrenerger Aktivierung nicht durch PP1 entgegengewirkt wird. Im Einklang damit führte eine β -adrenerge Stimulation trotz erhöhter Proteinphosphataseaktivität zur Angleichung der Geschwindigkeit der zytosolischen Kalziumelimination und der PLN-Phosphorylierung an S16 zwischen RM und Kontrolle. Die

Aktivität von PP1 zeigte einen Trend hin zu höherer Aktivität, welcher nicht auf Unterschieden in der Proteinexpression beruhte. Generell zeigten sich bei keinem der im RM untersuchten Proteine Unterschiede in der Proteinexpression. Dies lässt vermuten, dass zu diesem frühen Zeitpunkt nach I/R im RM eher post-translationale Mechanismen eine Rolle spielen. PP2A ist unter anderem verantwortlich für die Dephosphorylierung von I-1²⁸. Diese Dephosphorylierung führt zur Inaktivierung von I-1. Somit kann eine Aktivierung von PP2A die PP1-Aktivität verstärken. Die gesteigerte PP2A-Aktivität liefert so eine mögliche Erklärung für die tendenziell stärkere PP1-Aktivität. Darüber hinaus konnte eine verstärkte PKC-Aktivität im RM 24 Stunden nach I/R gezeigt werden¹²⁹. Die PKC-abhängige Phosphorylierung von I-1 führt zu dessen Inaktivierung, sodass eine gesteigerte PKC-Aktivität ebenfalls zur gesteigerten Aktivität von PP1 beitragen könnte⁹⁷. Neben der PLN-Phosphorylierungsstelle S16 dephosphorylieren PP1 und PP2A unter anderem PLN und RyR2 an den Phosphorylierungsstellen T17 bzw. S2808^{23,117}. Da der Phosphorylierungszustand dieser Phosphorylierungsstellen unverändert war, liegt vermutlich eine lokal differentiell regulierte Proteinphosphataseaktivität bzw. -spezifität vor. Die Substratspezifität, Lokalisation und Aktivität von PP1 und PP2A werden durch eine Vielzahl verschiedener Untereinheiten reguliert¹⁰⁹. Die spezifischen Funktionen sind für einen Großteil dieser Untereinheiten nicht bekannt. Der spezifische Effekt auf die S16-Phosphorylierung von PLN lässt vermuten, dass neben der gesteigerten Gesamtaktivität von PP1 und PP2A auch regulatorische Untereinheiten dieser Proteinphosphatasen eine Rolle spielen. Dadurch könnte die Phosphataseaktivität gegenüber einer bestimmten Phosphorylierungsstelle lokal höher ausfallen, als es die Messung der Gesamtaktivität vermuten lässt. Im Falle von PP1 ist die Untereinheit G_m an der Interaktion zwischen PP1 und PLN beteiligt¹³⁰. Die durch G_m vermittelte Interaktion stellt dadurch eine mögliche Grundlage für weiterführende Experimente dar.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten eine ursächliche Beteiligung erhöhter PLN-Aktivität an der Verlangsamung der zytosolischen Kalziumelimination durch SERCA2a im *remote* Myokard (Abbildung 41). Die verringerte PKA-abhängige Phosphorylierung von PLN konnte dabei als Grund für die gesteigerte inhibitorische Aktivität identifiziert werden. Die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A tragen dabei zur verringerten PLN-Phosphorylierung bei und verstärken so die PLN-vermittelte SERCA2a-Inhibition.

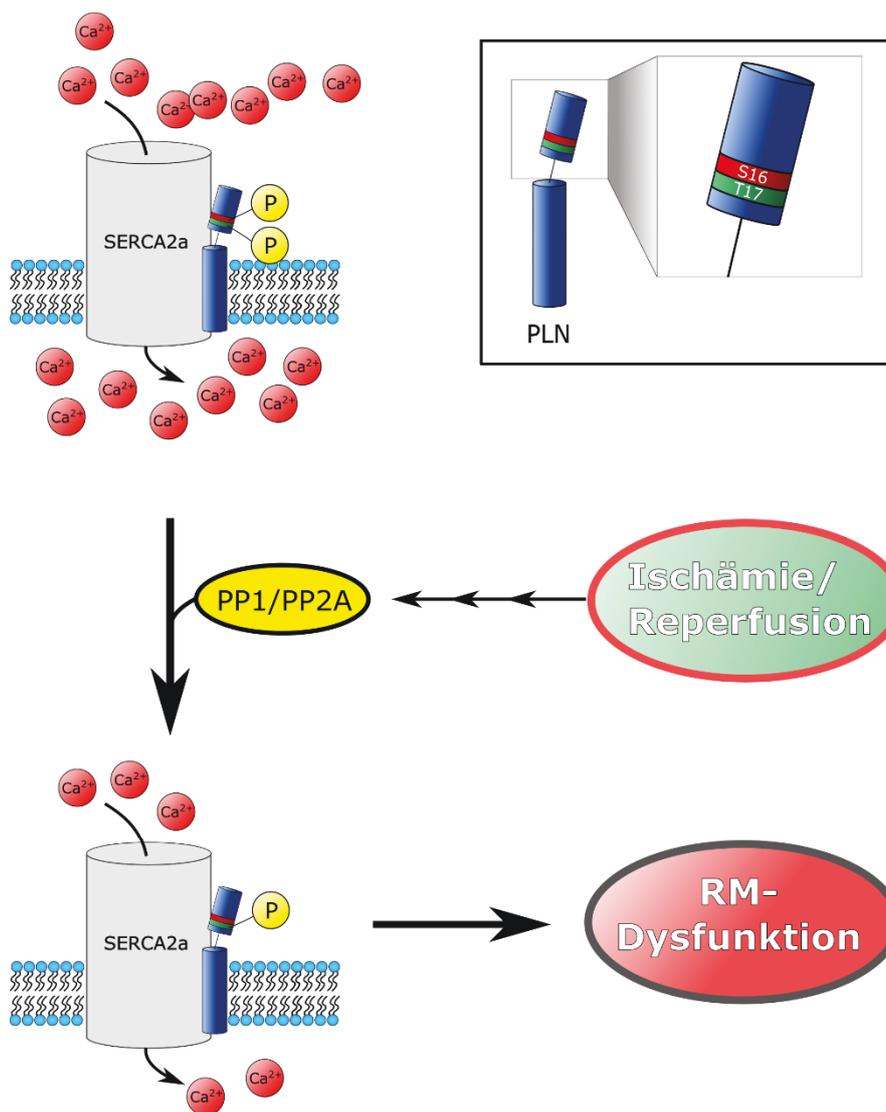


Abbildung 41 Modell der in der vorliegenden Arbeit identifizierten molekularen Mechanismen, welche zur funktionellen Einschränkung von Kardiomyozyten des *remote* Myokards führen. Im Zuge von Ischämie und Reperfusion kommt es innerhalb von 24 Stunden nach Ischämie zu einer Aktivierung der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A. Dies führt zur verstärkten Dephosphorylierung von PLN an S16, wodurch es zu einer verstärkten PLN-vermittelten SERCA2a-Inhibition kommt. Der daraus resultierende verlangsamte kardiomyozytäre Kalziumkreislauf führt schließlich zur Einschränkung der Kardiomyozytenfunktion im *remote* Myokard.

5 Zusammenfassung

Transiente Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration regulieren in allen Muskelzellen Kontraktion und Relaxation. In Kardiomyozyten ist die Kalzium-ATPase SERCA2a entscheidend für die zytosolische Kalziumelimination während der Diastole verantwortlich und deshalb von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der zellulären Kalziumhomöostase. Fehlfunktionen von SERCA2a können zudem ursächlich für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sein. Daher ist das detaillierte Verständnis von Mechanismen, die die SERCA2a-Aktivität regulieren, von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

Der wichtigste Regulator der SERCA2a ist Phospholamban (PLN). PLN liegt in einem Gleichgewicht zwischen Monomeren und Pentameren vor. Während Monomere eine direkte Inhibition von SERCA2a vermitteln, ist die funktionelle Rolle der Pentamere bisher unklar. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass PLN auch in seiner pentameren Form eine wichtige Funktion in der Regulation von SERCA2a besitzt. PLN-Pentamere verstärkten in einem Mausmodell die PLN-vermittelte SERCA2a-Inhibition, indem sie den Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren reduzierten. Nach β -adrenerger Stimulation ließen Pentamere dagegen die vollständige Inaktivierung von PLN-Monomeren zu. Dadurch erweitert die Pentamerbildung den Bereich, in dem SERCA2a-Aktivität reguliert werden kann. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Pathogenese der durch eine Arg9Cys-Mutation des PLN (PLN-R9C) verursachten dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Bildung von Heteropentameren zwischen Wildtyp-PLN und PLN-R9C, wie sie im heterozygoten Organismus vorliegt, eine kritische Rolle für die Entwicklung der DCM besitzt. Die Unterdrückung der Heteropentamerbildung führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von PLN-Monomeren und konnte den Erkrankungsbeginn *in vivo* signifikant hinauszögern. Heteropentamere stellen somit einen vielversprechenden Angriffspunkt für eine Krankheitsprävention in Trägern der PLN-R9C-Mutation dar.

Der dritte Teil dieser Arbeit untersuchte am Mausmodell 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion die Ursachen der Kardiomyozytendysfunktion im nicht-infarzierten *remote* Myokard (RM). Es wird angenommen, dass die schlechte Funktion des RM zu der hohen Mortalität der Patienten in der Frühphase nach Myokardinfarkt beiträgt. In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass eine verstärkte PLN-vermittelte SERCA2a-Inhibition, welche auf einer verringerten Phosphorylierung von PLN beruhte, im RM den Kalziumkreislauf der Herzmuskelzellen sowie deren Kontraktion und Relaxation verlangsamte. Bei der Abklärung der Ursachen für die reduzierte PLN-Phosphorylierung zeigte sich eine gesteigerte Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A. Die Normalisierung des Phosphorylierungszustands von PLN normalisierte auch den intrazellulären Kalziumkreislauf. Sie könnte deshalb einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt zur Verbesserung der RM-Funktion darstellen.

6 Summary

Transient alterations of the cytosolic calcium concentration regulate contraction and relaxation in all muscle cells. In cardiomyocytes, the Ca^{2+} -ATPase SERCA2a is crucially involved in the elimination of calcium from the cytosol during diastole and therefore of essential importance for maintaining calcium homeostasis. Furthermore, SERCA2a dysregulation can be causally involved in the pathogenesis of heart failure. On this account, it is of great interest to gain a detailed understanding of mechanisms regulating SERCA2a activity in health and disease.

The SERCA2a-regulatory protein PLN exists in an equilibrium between monomers and pentamers. While monomers facilitate direct SERCA2a inhibition the functional role of pentamer formation is less well defined. The present work shows for the first time that PLN pentamers are critically involved in SERCA2a regulation. Under basal conditions, PLN pentamers augmented PLN-mediated SERCA2a inhibition by reducing the phosphorylation state of PLN monomers in a mouse model. At the same time pentamers allowed for complete inactivation of monomers after beta-adrenergic stimulation. Thereby pentamers broaden the range within which SERCA2a activity can be regulated.

The second part of the present work establishes a role of PLN pentamers in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCM), caused by Arg9Cys mutation of PLN (PLN-R9C). The present work demonstrates that formation of heteropentamers between wildtype PLN and PLN-R9C, as it occurs in the heterozygous organism, is involved in the pathogenesis of DCM. Suppression of heteropentamer formation led to enhanced phosphorylation of PLN monomers and could delay disease onset *in vivo*. Therefore, heteropentamers constitute a promising target for preventive therapeutical interventions in individuals affected by the PLN-R9C mutation.

The third part of this work examines the underlying mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in the non-infarcted remote myocardium (RM) 24 hours post ischemia/reperfusion. Depressed RM function may contribute to the high mortality observed in patients during the early phase after myocardial infarction. In the present work, depression of calcium cycling due to excessive SERCA2a inhibition led to impaired contraction and relaxation of cardiomyocytes isolated from the RM. Mechanistically, increased SERCA2a inhibition resulted from reduced PLN phosphorylation which involved the increased activity of the protein phosphatases PP1 and PP2A. Normalization of PLN phosphorylation also normalized intracellular calcium cycling and could therefore constitute a novel therapeutic approach to improve RM function after myocardial infarction.

7 Literaturverzeichnis

1. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, Nodari S, Lam CSP, Sato N, Shah AN, Gheorghiade M. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: Lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1123-1133. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.053
2. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*. 2014;171:368-376. doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.028
3. Hobbs FDR, Roalfe AK, Davis RC, Davies MK, Hare R. Prognosis of all-cause heart failure and borderline left ventricular systolic dysfunction: 5 Year mortality follow-up of the Echocardiographic Heart of England Screening Study (ECHOES). *Eur Heart J*. 2007;28:1128-1134. doi:10.1093/eurheartj/ehm102
4. Towbin J a, Lowe AM, Colan SD, Sleeper L a, Orav EJ, Clunie S, Messere J, Cox GF, Lurie PR, Hsu D, Canter C, Wilkinson JD, Lipshultz SE. Incidence, Causes, and Outcomes of Dilated Cardiomyopathy in Children. *JAMA*. 2006;296:1867-1876. doi:10.1001/jama.296.15.1867
5. Monserrat L, Hermida M, Bouzas B, Mosquera I, Mahon N, Peteiro J, Alvarez N, Penas-Lado M, Crespo M, Castro-Beiras A. Familial dilated cardiomyopathy in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:725-732. doi:10.1016/S0300-8932(02)76691-8
6. Lou Q, Janardhan A. El. Remodeling of Calcium Handling in Human Heart Failure. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:1-29. doi:10.1007/978-94-007-2888-2
7. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Core Top Card Anesth Second Ed*. 2012;415:13-17. doi:10.1017/CBO9780511979095.008
8. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res*. 2016;118:400-409. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
9. Zhou P, Pu W. Recounting cardiac cellular composition. *Circ Res*. 2016;118:368-370. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308139
10. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
11. Kühlbrandt W. Biology, Structure and Mechanism of P-type ATPases. 2004;5:282-295. doi:10.1038/nrm1354
12. Clarke DM, Loo TW, Inesi G, MacLennan DH. Location of high affinity Ca²⁺-binding

- sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature*. 1989;339:476-478. doi:10.1038/339476a0
13. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*. 2007;35:430-442. doi:10.1002/mus.20745
 14. Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005;68:366-375. doi:10.1016/j.cardiores.2005.08.010
 15. Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban regulates the Ca²⁺-ATPase through intramembrane interactions. *J Biol Chem*. 1996;271:21726-21731. doi:10.1074/jbc.271.36.21726
 16. Cantilina T, Sagara Y, Inesi G, Jones LR. Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPases: Effect of a phospholamban antibody on enzyme activation by Ca²⁺. *J Biol Chem*. 1993;268:17018-17025.
 17. Chen Z, Akin BL, Jones LR. Mechanism of reversal of phospholamban inhibition of the cardiac Ca²⁺-ATPase by protein kinase A and by anti-phospholamban monoclonal antibody 2D12. *J Biol Chem*. 2007;282:20968-20976. doi:10.1074/jbc.M703516200
 18. Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG. A Single Site (Ser16) Phosphorylation in Phospholamban Is Sufficient in Mediating Its Maximal Cardiac Responses to beta-Agonists. *J Biol Chem*. 2000;275:38938-38943. doi:10.1074/jbc.M004079200
 19. Bidwell P, Blackwell DJ, Hou Z, Zima A V., Robia SL. Phospholamban binds with differential affinity to calcium pump conformers. *J Biol Chem*. 2011;286:35044-35050. doi:10.1074/jbc.M111.266759
 20. Karim CB, Zhang Z, Howard EC, Torgersen KD, Thomas DD. Phosphorylation-dependent Conformational Switch in Spin-labeled Phospholamban Bound to SERCA. *J Mol Biol*. 2006;358:1032-1040. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.051
 21. Metcalfe EE, Traaseth NJ, Veglia G. Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban. *Biochemistry*. 2005;44:4386-4396. doi:10.1021/bi047571e
 22. Cohen P. The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. *Annu Rev Biochem*. 1989;453-508. doi:10.1146/annurev.bi.58.070189.002321
 23. Macdougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem*. 1991;196:725-734. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb15871.x

24. Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S. Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry*. 1996;35:5220-5228. doi:10.1021/bi952940f
25. Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molkentin JD, Nairn AC, Bibb JA. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem*. 2006;281:24322-24335. doi:10.1074/jbc.M603282200
26. Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2007;293:H762-H769. doi:10.1152/ajpheart.00104.2007
27. Roy D, Steyer GJ, Gargasha M, Stone ME, Wilson L. Constitutive phosphorylation of inhibitor-1 at Ser67 and Thr75 depresses calcium cycling in cardiomyocytes and leads to remodeling upon aging. 2009;292:342-351. doi:10.1002/ar.20849.3D
28. El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346:700-706. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.182
29. El-Armouche A, Wittköpper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didié M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsöld B, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T. Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2008;80:396-406. doi:10.1093/cvr/cvn208
30. Weber S, Meyer-Roxlau S, Wagner M, Dobrev D, El-Armouche A. Counteracting protein kinase activity in the heart: The multiple roles of protein phosphatases. *Front Pharmacol*. 2015;6:270. doi:10.3389/fphar.2015.00270
31. Adams PD, Arkin IT, Engelman DM, Brünger AT. Computational searching and mutagenesis suggest a structure for the pentameric transmembrane domain of phospholamban. *Nat Struct Biol*. 1995;2:154-162. doi:10.1038/nsb0295-154
32. Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban Inhibitory Function Is Activated by Depolymerization. *J Biol Chem*. 1997;272:15061-15065. doi:10.1074/jbc.272.24.15061
33. Reddy LG, Jones LR, Thomas DD. Depolymerization of phospholamban in the presence of calcium pump: A fluorescence energy transfer study. *Biochemistry*. 1999;38:3954-3962. doi:10.1021/bi981795d

34. Vostrikov V V., Mote KR, Verardi R, Veglia G. Structural dynamics and topology of phosphorylated phospholamban homopentamer reveal its role in the regulation of calcium transport. *Structure*. 2013;21:2119-2130. doi:10.1016/j.str.2013.09.008
35. Kelly EM, Hou Z, Bossuyt J, Bers DM, Robia SL. Phospholamban oligomerization, quaternary structure, and sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase binding measured by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem*. 2008;283:12202-12211. doi:10.1074/jbc.M707590200
36. Li M, Cornea RL, Autry JM, Jones LR, Thomas DD. Phosphorylation-induced structural change in phospholamban and its mutants, detected by intrinsic fluorescence. *Biochemistry*. 1998;37:7869-7877. doi:10.1021/bi9801053
37. Cornea RL, Jones LR, Autry JM, Thomas DD. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry*. 1997;36:2960-2967. doi:10.1021/bi961955q
38. Simmerman HKB, Kobayashi YM, Autry JM, Jones LR. A Leucine Zipper Stabilizes the Pentameric Membrane Domain of Phospholamban and Forms a Coiled-coil Pore Structure. *J Biol Chem*. 1996;271:5941-5946. doi:10.1074/jbc.271.10.5941
39. Cornea RL, Autry JM, Jones LR, Chen Z. Reexamination of the Role of the Leucine/Isoleucine Zipper Residues of Phospholamban in Inhibition of the Ca²⁺ Pump of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*. 2000;275:41487-41494. doi:10.1074/jbc.M00815200
40. Fujii J, Maruyama K, Tada M, MacLennan DH. Expression and site-specific mutagenesis of phospholamban. Studies of residues involved in phosphorylation and pentamer formation. *J Biol Chem*. 1989;264:12950-12955. doi:10.1097/PAS.0000000000000291
41. Karim CB, Marquardt CG, Stamm JD, Barany G, Thomas DD. Synthetic null-cysteine phospholamban analogue and the corresponding transmembrane domain inhibit the Ca-ATPase. *Biochemistry*. 2000;39:10892-10897. doi:10.1021/bi0003543
42. Zamoon J, Mascioni A, Thomas DD, Veglia G. NMR solution structure and topological orientation of monomeric phospholamban in dodecylphosphocholine micelles. *Biophys J*. 2003;85:2589-2598. doi:10.1016/S0006-3495(03)74681-5
43. Zvaritch E, Backx PH, Jirik F, Kimura Y, De Leon S, Schmidt AG, Hoit BD, Lester JW, Kranias EG, MacLennan DH. The transgenic expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility. *J Biol Chem*. 2000;275:14985-14991. doi:10.1074/jbc.275.20.14985

44. Jones LR, Cornea RL, Chen Z. Close proximity between residue 30 of phospholamban and cysteine 318 of the cardiac Ca²⁺pump revealed by intermolecular thiol cross-linking. *J Biol Chem*. 2002;277:28319-28329. doi:10.1074/jbc.M204085200
45. Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T, MacLennan DH. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:467-472. doi:10.1073/pnas.0237326100
46. Akin BL, Hurley TD, Chen Z, Jones LR. The structural basis for phospholamban inhibition of the calcium pump in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2013;288:30181-30191. doi:10.1074/jbc.M113.501585
47. Graves JP, Trieber CA, Ceholski DK, Stokes DL, Young HS. Phosphorylation and mutation of phospholamban alter physical interactions with the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Mol Biol*. 2011;405:707-723. doi:10.1016/j.jmb.2010.11.014
48. Stokes DL, Pomfret AJ, Rice WJ, Graves JP, Young HS. Interactions between Ca²⁺-ATPase and the pentameric form of phospholamban in two-dimensional co-crystals. *Biophys J*. 2006;90:4213-4223. doi:10.1529/biophysj.105.079640
49. MacLennan DH, Toyofuku T, Kimura Y. Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban. *Basic ResCardiol*. 1997;92 Suppl 1:11-15. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08254.x
50. Morita T, Hussain D, Asahi M, Tsuda T, Kurzydowski K, Toyoshima C, MacLennan DH. Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369:188-194. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.098
51. Thomas DD, Reddy LG, Karim CB, Li M, Cornea RL, Autry JM, Jones LR, Stamm J. Direct Spectroscopic Detection of Molecular Dynamics and Interactions of the Calcium Pump and Phospholamban. *Ann New York Acad Sci*. 1998;16:186-194. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08266.x
52. Becucci L, Cembran A, Karim CB, Thomas DD, Guidelli R, Gao J, Veglia G. On the function of pentameric phospholamban: Ion channel or storage form? *Biophys J*. 2009;96:L60-L62. doi:10.1016/j.bpj.2009.03.013
53. Chu G, Li L, Sato Y, Harrer JM, Kadambi VJ, Hoit BD, Bers DM, Kranias EG. Pentameric assembly of phospholamban facilitates inhibition of cardiac function in vivo. *J Biol Chem*. 1998;273:33674-33680. doi:10.1074/jbc.273.50.33674
54. Ceholski DK, Trieber C a, Young HS. Hydrophobic imbalance in the cytoplasmic domain of phospholamban is a determinant for lethal dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*.

- 2012;287:16521-16529. doi:10.1074/jbc.M112.360859
55. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*. 2003;299:1410-1413. doi:10.1126/science.1081578
 56. Vafiadaki E, Sanoudou D, Arvanitis D a, Catino DH, Kranias EG, Kontrogianni-Konstantopoulos A. Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function. *J Mol Biol*. 2007;367:65-79. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.057
 57. Bidwell PA, Haghghi K, Kranias EG. The antiapoptotic protein HAX-1 mediates half of phospholamban's inhibitory activity on calcium cycling and contractility in the heart. *J Biol Chem*. 2018;293:359-367. doi:10.1074/jbc.RA117.000128
 58. Vafiadaki E, Arvanitis D. The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival. *Mol Biol Cell*. 2009;20:306-318. doi:10.1091/mbc.E08
 59. Han Y, Chen Y-S, Liu Z, Bodyak N, Rigor D, Bisping E, Pu WT, Kang PM. Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circ Res*. 2006;99:415-423. doi:10.1161/01.RES.0000237387.05259.a5
 60. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 1999;1450:191-231. doi:10.1016/S0167-4889(99)00058-0
 61. Rustandi RR, Baldisseri DM, Inman KG, Nizner P, Hamilton SM, Landar A, Landar A, Zimmer DB, Weber DJ. Three-dimensional solution structure of the calcium-signaling protein apo-S100A1 as determined by NMR. *Biochemistry*. 2002;41:788-796. doi:10.1021/bi0118308
 62. Kiewitz R, Acklin C, Schäfer BW, Maco B, Uhrík B, Wuytack F, Erne P, Heizmann CW. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:550-557. doi:10.1016/S0006-291X(03)00987-2
 63. Kettlewell S, Most P, Currie S, Koch WJ, Smith GL. S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:900-910. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.06.018
 64. Most P. Distinct subcellular location of the Ca²⁺-binding protein S100A1 differentially modulates Ca²⁺-cycling in ventricular rat cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2005;118:421-431. doi:10.1242/jcs.01614

65. Most P, Remppis A, Pleger ST, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockman HA, Duncan SJ, Katus HA, Koch WJ. Transgenic Overexpression of the Ca²⁺-binding Protein S100A1 in the Heart Leads to Increased in Vivo Myocardial Contractile Performance. *J Biol Chem*. 2003;278:33809-33817. doi:10.1074/jbc.M301788200
66. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PML, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1: A regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:13889-13894. doi:10.1073/pnas.241393598
67. Völkers M, Loughrey CM, MacQuaide N, Remppis A, DeGeorge BR, Wegner F v., Friedrich O, Fink RHA, Koch WJ, Smith GL, Most P. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2007;41:135-143. doi:10.1016/j.ceca.2006.06.001
68. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Völkers M, Heierhorst J, Remppis A, Pleger ST, DeGeorge BR, Eckhart AD, Feldman AM, Koch WJ. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:1258-1268. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.622415
69. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *Eur Heart J*. 2017;38:774-784. doi:10.1093/eurheartj/ehw224
70. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*. 2014;383:1933-1943. doi:10.1016/S0140-6736(14)60107-0
71. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*. 2018;357:1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667
72. Nah D-Y, Rhee M-Y. The Inflammatory Response and Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Korean Circ J*. 2009;39:393. doi:10.4070/kcj.2009.39.10.393
73. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR, Huang P. The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1344-1365. doi:10.1089/ars.2007.1957
74. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.Cell
75. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury:

- preconditioning , postconditioning , and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2018;5-7. doi:10.1152/ajpheart.00553.2011.
76. Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010;47:122-129. doi:10.1016/j.ceca.2010.01.003
77. French JP. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *AJP Hear Circ Physiol*. 2005;290:H128-H136. doi:10.1152/ajpheart.00739.2005
78. Krause S, Hess ML. Characterization of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Dysfunction during Short-Term, Normothermic, Global Ischemia. *Circ Res*. 1984;176-185. doi:10.1161/01.RES.55.2.176
79. Kaplan P, Hendriks M, Mattheussen M, Mubagwa K, Flameng W. Effect of Ischemia and Reperfusion on Sarcoplasmic Reticulum Calcium Uptake. *Circ Res*. 1992;71:1123-1130. doi:10.1161/01.RES.71.5.1123
80. Zucchi R, Ronca-Testoni S, Di Napoli P, Yu G, Gallina S, Bosco G, Ronca G, Calafiore AM, Mariani M, Barsotti A. Sarcoplasmic Reticulum Calcium Uptake in Human Myocardium Subjected to Ischemia and Reperfusion During Cardiac Surgery. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1693-1701. doi:10.1006/jmcc.1996.0159
81. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:5622-5627. doi:10.1073/pnas.0305778101
82. Talukder MAH, Kalyanasundaram A, Zhao X, Zuo L, Bhupathy P, Babu GJ, Cardounel AJ, Periasamy M, Zweier JL. Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction. *AJP Hear Circ Physiol*. 2007;293:H2418-H2428. doi:10.1152/ajpheart.00663.2007
83. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, Kurabayashi M. Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial Infarction in rats. *Mol Ther*. 2008;16:1026-1032. doi:10.1038/mt.2008.61
84. Talukder M, Yang F, Nishijima Y, Chen C-A, Kalyanasundaram A, Periasamy M, Zweier JL. Reduced SERCA2a converts sub-lethal myocardial injury to infarction and affects postischemic functional recovery. 2009;46:285-287. doi:10.1016/j.asieco.2008.09.006.EAST

85. Binek A, Fernández-jiménez R, Jorge I, López JA, Bagwan N, Galán-arriola C, Pun A, Agüero J, Fuster V, Ibanez B, Vázquez J. Proteomic footprint of myocardial ischemia/reperfusion injury: Longitudinal study of the at-risk and remote regions in the pig model. *Sci Rep.* 2017;1-16. doi:10.1038/s41598-017-11985-5
86. Cochrane AD, Pathik S, Smolich JJ, Conyers RAJ, Rosenfeldt FL. Depressed function in remote myocardium after myocardial infarction: Influence of orotic acid. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1765-1772. doi:10.1016/S0003-4975(96)00673-X
87. Kramer CM, Lima JAC, Reichek N. Regional Differences in Function Within Noninfarcted Myocardium During Left Ventricular Remodeling. *Circulation.* 1993;88:1279-1289. doi:10.1161/01.CIR.88.3.1279
88. Kristensen SD, Laut KG, Fajadet J, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: Current status in 37 ESC countries. *Eur Heart J.* 2014;35:1957-1970. doi:10.1093/eurheartj/eh529
89. Kleiman NS, White HD, Ohman EM, Ross a M, Woodlief LH, Califf RM, Holmes DR, Bates E, Pfisterer M, Vahanian A. Mortality within 24 hours of thrombolysis for myocardial infarction. The importance of early reperfusion. The GUSTO Investigators, Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. *Circulation.* 1994;90:2658-2665. doi:10.1161/01.CIR.90.6.2658
90. Kuch B, Bolte HD, Hoermann A, Meisinger C, Loewel H. What is the real hospital mortality from acute myocardial infarction? Epidemiological vs clinical view. *Eur Heart J.* 2002;23:714-720. doi:10.1053/euhj.2001.2947
91. Wittmann T, Lohse MJ, Schmitt JP. Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;80:90-97. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.020
92. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2745-2752. doi:10.1128/MCB.7.8.2745
93. Merx MW, Gorressen S, Van De Sandt AM, Cortese-Krott MM, Ohlig J, Stern M, Rassaf T, Gödecke A, Gladwin MT, Kelm M. Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109:1-10. doi:10.1007/s00395-013-0398-1
94. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res.* 1994;75:401-409. doi:10.1161/01.RES.75.3.401

95. Schmitt JP, Ahmad F, Lorenz K, Hein L, Schulz S, Asahi M, MacLennan DH, Seidman CE, Seidman JG, Lohse MJ. Alterations of phospholamban function can exhibit cardiotoxic effects independent of excessive sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibition. *Circulation*. 2009;119:436-444. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783506
96. Ha KN, Masterson LR, Hou Z, Verardi R, Walsh N. Lethal Arg9Cys phospholamban mutation hinders Ca²⁺-ATPase regulation and phosphorylation by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;7:2735-2740. doi:10.1073/pnas.1013987108
97. Weber S, Meyer-Roxlau S, El-Armouche A. Role of protein phosphatase inhibitor-1 in cardiac beta adrenergic pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;101:116-126. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.09.007
98. Kronenbitter A, Funk F, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stühler K, Isić M, Krüger M, Schmitt JP. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;119:28-39. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.004
99. Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE. Impaired Cardiac Performance in Heterozygous Mice with a Null Mutation in the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Isoform 2 (SERCA2) Gene. *J Biol Chem*. 1999;274:2556-2562. doi:10.1074/jbc.274.4.2556
100. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content in Isolated Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res*. 1999;85:38-46. doi:10.1161/01.RES.85.1.38
101. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre A, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;10:29-41. doi:10.1517/14712590903321462
102. Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H. Gene expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res*. 1994;75:443-453. doi:10.1161/01.RES.75.3.443
103. del Monte F, Hajjar RJ. Intracellular devastation in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2008;13:151-162. doi:10.1007/s10741-007-9071-9
104. van der Zwaag P a, van Rijsingen I a W, Asimaki A, et al. Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:1199-1207. doi:10.1093/eurjhf/hfs119

105. Robia SL, Campbell KS, Kelly EM, Hou Z, Winters DL, Thomas DD. Förster transfer recovery reveals that phospholamban exchanges slowly from pentamers but rapidly from the SERCA regulatory complex. *Circ Res.* 2007;101:1123-1129. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.159947
106. Aschar-Sobbi R, Emmett TL, Kargacin GJ, Kargacin ME. Phospholamban phosphorylation increases the passive calcium leak from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2012;464:295-305. doi:10.1007/s00424-012-1124-9
107. Becucci L, Papini M, Verardi R, Veglia G, Guidelli R. Phospholamban and its phosphorylated form require non-physiological transmembrane potentials to translocate ions. *Soft Matter.* 2012;8:3881. doi:10.1039/c2sm07107j
108. Brittsan AG, Carr AN, Schmidt AG, Kranias EG. Maximal inhibition of SERCA2 Ca²⁺ affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban. *J Biol Chem.* 2000;275:12129-12135. doi:10.1074/jbc.275.16.12129
109. Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;64:90-98. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.09.006
110. Kirchhefer U, Baba HA, Bokník P, Breeden KM, Mavila N, Brüchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, DePaoli-Roach AA, Neumann J. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res.* 2005;68:98-108. doi:10.1016/j.cardiores.2005.05.019
111. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE. Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2871-2886. doi:10.1016/j.jacc.2016.08.079
112. Fish M, Shaboodien G, Kraus S, Sliwa K, Seidman CE, Burke MA, Crotti L, Schwartz PJ, Mayosi BM. Mutation analysis of the phospholamban gene in 315 South Africans with dilated , hypertrophic , peripartum and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies. *Sci Rep.* 2016;6:22235. doi:10.1038/srep22235
113. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14:213-224. doi:10.1007/s10741-009-9146-x
114. Ceholski DK, Trieber C a, Holmes CFB, Young HS. Lethal, hereditary mutants of phospholamban elude phosphorylation by protein kinase A. *J Biol Chem.*

- 2012;287:26596-26605. doi:10.1074/jbc.M112.382713
115. WHO. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. 2018.
116. Dastidar A, McAlindon E, Rodrigues JC, Baritussio A, Scatteia A, Garate E, Lawton CB, Bucciarelli-Ducci C, Abbate A, Bonanno E, Mauriello A, Dabir D, Child N, Kalra A. Remote myocardium is also affected in acute myocardial infarction: evidence from advanced CMR relaxometry. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2016;18:P219. doi:10.1186/1532-429X-18-S1-P219
117. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37:417-429. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.026
118. Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376:80-85. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.084
119. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation Between Myocardial Function and Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res.* 1994;75:434-442. doi:10.1161/01.RES.75.3.434
120. Remppis A, Greten T, Schäfer BW, Hunziker P, Erne P, Katus HA, Heizmann CW. Altered expression of the Ca²⁺-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1996;1313:253-257. doi:10.1016/0167-4889(96)00097-3
121. Brinks H, Rohde D, Voelkers M, Qiu G, Pleger ST, Herzog N, Rabinowitz J, Ruhparwar A, Silvestry S, Lerchenmiller C, Mather PJ, Eckhart AD, Katus HA, Carrel T, Koch WJ, Most P. S100A1 genetically targeted therapy reverses dysfunction of human failing cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:966-973. doi:10.1016/j.jacc.2011.03.054
122. Desjardins J-F, Pourdjabbar A, Quan A, Leong-Poi H, Teichert-Kuliszewska K, Verma S, Parker TG. Lack of S100A1 in mice confers a gender-dependent hypertensive phenotype and increased mortality after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H1457-65. doi:10.1152/ajpheart.00088.2008
123. Richardt G, Münch G, Neumann FJ, Rauch B, Kurz T. Systemic and cardiac catecholamines during elective PTCA and during immediate PTCA for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 1997;92:52-60. doi:10.1007/BF00803757
124. Lameris TW, De Zeeuw S, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Man In 't Veld AJ, Van Den Meiracker AH. Time course and mechanism of myocardial

- catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation*. 2000;101:2645-2650. doi:10.1161/01.CIR.101.22.2645
125. Slavikova J, Kuncova J, Topolcan O. Plasma catecholamines and ischemic heart disease. *Clin Cardiol*. 2007;30:326-330. doi:10.1002/clc
126. Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G, Nikolaev VO. In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor–microdomain communication in cardiac disease. *Nat Commun*. 2015;6:6965. doi:10.1038/ncomms7965
127. Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Taskén K, Klussmann E. AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2007;8:1061-1067. doi:10.1038/sj.embor.7401081
128. Singh A, Redden JM, Kapiloff MS, Dodge-Kafka KL. The Large Isoforms of A-Kinase Anchoring Protein 18 Mediate the Phosphorylation of Inhibitor-1 by Protein Kinase A and the Inhibition of Protein Phosphatase 1 Activity. *Mol Pharmacol*. 2011;79:533-540. doi:10.1124/mol.110.065425
129. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2016;119:1017-1029. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309685
130. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D, Kranias EG. Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0080867

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Kronenbitter A, **Funk F**, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stühler K, Isić M, Krüger M, Schmitt JP. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;119:28-39. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.004

Funk F, Krüger K, Henninger C, Wätjen W, Prosch P, Thomale J, Fritz G. Spongian Alkaloids Protect Rat Kidney Cells against Cisplatin-Induced Cytotoxicity. *Anti-Cancer Drugs.* 2014;25:917–29.

Die Ergebnisse des Abschnitts 3.3 der vorliegenden Arbeit sind in folgendes Manuskript eingeflossen:

Kronenbitter A, **Funk F**, Hackert K, Gorreßen S, Glaser D, Boknik P, Poschmann G, Stühler K, Isić M, Krüger M, Schmitt JP. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;119:28-39. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.004

Die proteinbiochemischen Analysen für diese Publikation wurden von Herrn Funk durchgeführt. Konkret umfassten diese Arbeiten die Analyse von Proteinexpression und -phosphorylierung in Herzgewebe des *remote* Myokards sowie der infarzierten Herzspitzen mittels *western blot*. Dabei wurde die Proteinexpression von RyR2, SERCA2a, PLN, HAX-1, S100A1, cTnI (Abbildung 3 A-C, S2 B), PKA und PP1 (Abbildung 7 A, B) sowie die Phosphorylierungszustände von PLN (S16 und T17), RyR2 (S2808 und S2814) und cTnI (S23/24) untersucht (Abbildung 5 B-E, S2 B). Darüber hinaus wurde der Phosphorylierungszustand von PLN-Monomeren mittels *phosphate mobility shift assay* (Phos-Tag™) unabhängig von phosphospezifischen Antikörpern untersucht (Abbildung 5 A). Herr Funk war an der Probenvorbereitung und Auswertung der in Abbildung 7 E dargestellten Daten beteiligt.

Kongressbeiträge

Enhanced phospholamban activity suppresses cardiomyocyte calcium cycling in the remote myocardium early after myocardial infarction.

Funk F, Kronenbitter A, Glaser D, Boknik P, Schmitt JP

79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), 26. Februar-1. März 2018, Göttingen

Oligomerization enhances basal PLN activity in vivo by attenuating PKA- dependent phosphorylation.

Funk F, Kronenbitter A, Schmitt JP

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 29. Februar-3. März 2016, Berlin

Auszeichnung mit dem 2. Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie.

Identification of natural compounds cisplatin doxorubicin Harpagophytum procumbens (Devil's claw) marine sponges.

Funk F, Henninger C, Proksch P, Fritz G

79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), 5.-7. März 2013, Halle-Wittenberg

Lebenslauf

Person

Name	Florian Konrad Alexander Funk
Geburtsdatum	07.06.1986
Geburtsort	Wuppertal
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

01/2013-09/2018	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5 ,40225 Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Joachim P. Schmitt
Thema	Mechanismen der Phospholamban-vermittelten Regulation von SERCA2a

Studium

10/2010-10/2012	Studium der Toxikologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abschluss: Master of Science
10/2007-10/2010	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Abschluss: Bachelor of Science

Schule

1996-2005	Helmholtz-Gymnasium Hilden
1992-1996	Gemeinschaftsgrundschule Walder Straße, Hilden

Danksagung

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joachim P. Schmitt, für die Betreuung der Promotionsarbeit. Sein entgegengebrachtes Vertrauen, sein Ehrgeiz und seine stetige Gelassenheit haben mir auch in schwierigen Zeiten neuen Mut gegeben und die Arbeit zu dem gemacht, was sie ist. Insbesondere die fachlichen Diskussionen, seine gute Betreuung und seine stets konstruktive Kritik haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der Mentorenschaft und die Begutachtung dieser Arbeit. PD Dr. Boknik danke ich für die freundliche Kooperation, die einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat und die methodischen Einblicke, die ich in seiner Arbeitsgruppe gewinnen durfte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen AG-Kolleginnen für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Die Zusammenarbeit war stets von Teamgeist und Zusammenhalt geprägt, sodass alle Höhen höher und alle Tiefen weniger tief erschienen.

Kerstin Freidel und Petra Rempel möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre zielführenden methodischen Tipps danken. Herzlicher Dank gilt auch Kirsten Bartkowski, die mit ihrem ausgedehnten methodischen Wissen immer eine große Hilfe war.

Erika Lohmann, Karin Montag und Sabine Lohmann danke ich für ihre guten organisatorischen Fähigkeiten und ihr fixes Handeln in allen Angelegenheiten.

Ich möchte auch allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche und die gute Atmosphäre danken. Sie alle haben dazu beigetragen, dass die Arbeit leichter und freudiger vonstatten ging. Einige Ideen und Fortschritte wären durch so manch anregendes Gespräch beim Mittagessen wohl nicht zustande gekommen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Hier fand ich stets Unterstützung, Rückhalt und die Motivation niemals aufzugeben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 16.07.2018

Florian Konrad Alexander Funk