Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

# Beeinflussung der Kontraktionskraft des Herzens über eine Proteinkinase C-abhängige Regulation der Proteinphosphatase 2A

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Christiane Brekle Tierärztin aus Emsdetten

> Berlin 2016 Journal-Nr.: 3887

## Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Salah Amasheh
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Uwe Kirchhefer
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Robert Klopfleisch

#### Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice; animal models; heart; contraction; calcium; protein kinase; phosphoric monoester hydrolases; isoprenaline; cardiovascular agents; ventricles; myocytes; cardiac (MeSH); actin cytoskeleton (MeSH); phenylephrine (MeSH); tetradecanoylphorbol acetate (MeSH)

Tag der Promotion: 07.10.2016

#### Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <a href="http://dnb.ddb.de">http://dnb.ddb.de</a> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-764-4 Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016 Dissertation, Freie Universität Berlin D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © Mensch und Buch Verlag 2016 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung			1			
	1.1 Regulation der Kontraktion des Herzens					
	1.2	2 Regulation der Kontraktionskraft und des intrazellulären Kalzium-Handlings				
		durch die Proteinphosphatase 2A				
	1.3	3 Beeinflussung der PP2A-Aktivität durch Carboxymethylierung und				
		Pho	sphorylierung ihrer regulatorischen Untereinheiten	6		
2	Fra	agest	ellung	11		
3 Material und Met			l und Methoden	12		
3.1 Genetisch veränderte Mausmodelle			etisch veränderte Mausmodelle	12		
	3.2	Gen	otypisierung	12		
	3.3	Phy	siologische Messungen	14		
	3.	.3.1	Isolation adulter ventrikulärer Kardiomyozyten	14		
	3.	.3.2	Bestimmung der myozellulären Kalzium-Transienten	16		
	3.	.3.3	Kontraktionskraftmessungen an isolierten linken Vorhöfen im Organbad	20		
	3.4	Bio	chemische Untersuchungen	22		
3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford		Proteinbestimmung nach Bradford	22			
	3.	.4.2	Proteinphosphatase-Assay	23		
	3.	.4.3	Bestimmung der PKC-Aktivität	26		
	3.	.4.4	Immunpräzipitation	27		
	3.	.4.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	29		
	3.	.4.6	Western Blot	29		
	3.	.4.7	Ponceau-Färbung	30		
<ul><li>3.4.8 Immunologische Detektion</li><li>3.4.9 Nachweis phosphorylierter Proteine</li><li>3.4.10 Gelfärbung mittels Coomassie Brillant Blau</li></ul>		.4.8	Immunologische Detektion	30		
		.4.9	Nachweis phosphorylierter Proteine	31		
		Gelfärbung mittels Coomassie Brillant Blau	33			
	3.5	Stat	istik	34		
4	Er	gebni	sse	35		
	4.1	Ein	fluss einer Stimulation der PKC auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt			
von Kardiomyozy		von	Kardiomyozyten und multizellulären Präparaten	35		
	4.	.1.1	Einfluss unterschiedlicher PE-Konzentrationen auf die Kontraktilität und			
			den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten	35		
	4.	.1.2	Einfluss von Phenylephrin (PE) und Isoprenalin (ISO) auf die Kontraktilität			
			und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten	40		

	4.	1.3	Einfluss von Phenylephrin (PE) und Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	
			auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten und	
			Vorhofpräparaten	45
	4.2	Bes	timmung der PP2A-Aktivität unter verschiedenen Stimuli	58
	4.	2.1	Stimulation durch Phenylephrin	58
	4.	2.2	Stimulation durch PMA	59
4.		2.3	Stimulation durch PE und PMA	60
	4.3	Bes	timmung des Phosphorylierungsgrades von B56 $\alpha$ nach pharmakologischer	
		PK	C-Aktivierung	62
5	Dis	kuss	ion	69
	5.1	Pha	rmakologische Aktivierung der PKC durch Phenylephrin und PMA	71
	5.2	Cha	arakterisierung der myozellulären Kontraktion und Kalzium-Homöostase an	
		iso	lierten Kardiomyozyten und Vorhofpräparaten	72
	5.3	Bee	einflussung der PP2A-Aktivität durch direkte und indirekte Aktivierung der PKC	76
	5.4	Pho	osphorylierungsstatus von B56 $\alpha$ in isolierten Kardiomyozyten und Vorhofpräparaten	77
6	Zu	samı	menfassung	79
7	Su	mma	ıry	80
8	An	hang	5	82
	8.1	Puf	fer und Lösungen	82
9	Lit	erati	urverzeichnis	95
1(	) Ab	bild	ungs- und Tabellenverzeichnis	104
11	Pu	blika	ations- und Präsentationsverzeichnis	107
11	Da	nksa	igung	108
12	2 Sel	lbstä	ndigkeitserklärung	109

# 1 Einleitung

#### 1.1 Regulation der Kontraktion des Herzens

Das Herz als muskuläres Hohlorgan stellt ein komplexes Konstrukt aus unterschiedlichen Zelltypen dar. Durch die Kontraktilität des Herzens wird ständig Blut durch den Organismus gepumpt, um so die Versorgung aller Organe zu sichern. Verantwortlich für die Kontraktion ist neben der Reizbildung und Erregungsleitung vor allem das Arbeitsmyokard. Hier wird durch den eintreffenden elektrischen Reiz aus dem Erregungsleitungssystem das Ruhemembranpotential auf das Schwellenpotential gesteigert. Dies löst zuallererst einen depolarisierenden Natriumeinstrom aus und leitet damit das Aktionspotential ein. Zeitgleich werden L-Typ Kalziumkanäle aktiviert, um einen länger anhaltenden Kalziumeinstrom einzuleiten. Dieses hat eine Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Kalziumkanäle vom Ryanodinrezeptor (RyR) zur Folge (Abbildung 1). Danach entsteht durch einen repolarisierenden Kaliumausstrom die initiale Repolarisationsphase, welche in die Plateau-Phase übergeht. Nach kurzer Zeit klingt der Kalziumeinstrom langsam ab, der Kaliumausstrom jedoch bleibt weiterhin erhalten. Dadurch und durch nun aktivierte Kaliumkanäle ( $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$ ) kommt es zur Repolarisationsphase. Die schnelle und langsame Komponente der "delayed rectified"- Kaliumkanäle vermitteln die Repolarisation zum Ruhepotential und die Kombination aus  $I_{Kr}$  und  $I_{Ki}$  (*"inward rectified"-Kaliumkanal*) stabilisieren es auf diesem Niveau (Behere und Weindling, 2015; Fink et al., 2011; Habertheuer et al., 2014; Johnstone et al., 2015; Noble, 1962).

Der Kalziumeinstrom von außen über das Sarcolemm ins Zellinnere sowie die dadurch vermittelte Kalziumfreisetzung über den Ryanodinrezeptor aus dem SR führen dazu, dass der intrazelluläre Kalziumgehalt ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) steigt. Dieses Kalzium bindet während der Systole an Troponin C und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung des Troponin I (TnI), einer Phosphoprotein-Untereinheit vom Troponin-Tropomyosin-Komplex, wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf die Herzmuskelkontraktion aufgehoben wird. Es kommt zur Freilegung der Myosin-bindenden Seite des Aktins und somit kann das Myosinköpfchen unter ATP-Hydrolyse am Aktinfilament binden. Es entsteht eine Querbrücke. Durch die Abgabe des anorganischen Phosphats wird Energie frei, die eine stärkere Bindung zwischen Aktin und Myosin bedingt. Nach Freisetzung des ADP schiebt das Myosinköpfchen das Aktinfilament

in Richtung Zentrum der Herzmuskelzelle. Dadurch kommt es zur Annäherung der Glanzstreifen (Herzmuskelzellverbindungen).

Nach erneuter Bindung eines ATP-Moleküls am Myosinköpfchen löst sich das Myosinköpfchen vom Aktinfilament. Durch erneute Hydrolyse des ATP verlagert sich das Myosinköpfchen wieder in die Ausgangsposition und es kommt zur Relaxation. Die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) durch die Proteinkinase A beschleunigt die Rückführung von Kalzium über eine ATP-abhängige Kalziumpumpe (SERCA2a) in das SR und beschleunigt somit die Relaxation. (Erkasap, 2007; Vangheluwe et al., 2006). Auch der Natrium Kalzium Austauscher (Na/CaX) trägt durch den Austausch von Kalzium aus der Zelle gegen 3 Natrium Moleküle in die Zelle zur Relaxation bei. Aktiviert wird der Na/CaX jedoch nicht durch eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration, sondern durch den extrazellulären Natrium-Gradienten (Shattock et al., 2015).



Abbildung 1: Kalziumstrom im Kardiomyozyten. L-Typ Kalziumkanäle werden durch einen eintreffenden Reiz aktiviert, wodurch es zu einem Kalziumeinstrom ( $Ca^{2+}$ ) ins Sarkoplasma kommt. Dieses Kalzium aktiviert wiederum den Ryanodinrezeptor (RyR), welcher einen Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) vermittelt. Es kommt zu einer Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung (CICR). Dieses Kalzium lagert sich unter anderem an Troponin an und es kommt zur Kontraktion. Bei einem Phospholamban (PLB)-vermittelten Rücktransport des Kalziums ins sarkoplasmatische Retikulum kommt es zur Relaxation. Außerdem kommt es durch den Natrium-Kalzium Austauscher (Na/CaX) ebenfalls zur Reduktion der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Sarkoplasma. Illustration modifiziert nach Cosmocyte/Ben Smith (Priori und Chen, 2011).

Die vorgestellten Prozesse zur Regulation der myokardialen Kontraktion werden wiederum durch spezifische Proteinphosphatasen beeinflusst. So kommt es bei vermehrter Proteinphosphatase-Aktivität zu einer verminderten PLB- und TnI-Phosphorylierung. In der Folge wird die Relaxationszeit verzögert ist (Bartel et al., 1996; Bokník et al., 2000; Neumann et al., 1997).

# 1.2 Regulation der Kontraktionskraft und des intrazellulären Kalzium-Handlings durch die Proteinphosphatase 2A

Die Dephosphorylierung von Proteinen durch Proteinphosphatasen (PP) beeinflusst deren Eigenschaften durch Steigerung oder Hemmung der jeweiligen Enzymaktivität oder durch Regulation von Transkriptionsfaktoren. PPs entfernen die durch Proteinkinasen an Aminosäurereste angekoppelten Phosphatreste und lassen sich anhand ihrer Sensitivität gegenüber spezifischen Inhibitoren in zwei Typen (1 und 2) unterteilen (Cohen und Cohen, 1989; Cohen, 1989). PP1 wird durch spezifische, inhibitorische, hitze- und säurestabile Proteine (Inhibitoren 1 und 2) gehemmt. PPs vom Typ 2 hingegen sind unempfindlicher gegenüber diesen Inhibitoren. Sie können in die Subtypen 2A, 2B und 2C unterteilt werden (Tabelle 1; Cohen und Cohen, 1989).

#### Tabelle 1: Gebräuchliche Methoden zur Charakterisierung der Proteinphosphatasen

(modifiziert nach Cohen, 1989).

Beeinflussung	PP1	PP2A	PP2B	PP2C
Präferenz für Untereinheit der	β	α	α	α
Phosphorylase-Kinase	-			
Abhängigkeit von divalenten	Nein	Nein	Ja	Ja
Kationen			$(Ca^{2+})$	$(Mg^{2+})$
Stimulation durch Calmodulin	Nein	Nein	Ja	Nein
Hemmung durch Trifluoperazin	Nein	Nein	Ja	Nein
Hemmung durch Okadasäure	Ja	Ja	Ja	Nein
Phosphorylase-Phosphatase	Hoch	Hoch	Niedrig	Niedrig
Aktivität				
Dephosphorylierungsaktivität des	Sehr niedrig	Sehr hoch		
durch PKC phosphorylierten				
Histons H1				
Dephosphorylierungsaktivität des	Sehr niedrig	Hoch		
durch PKA phosphorylierten				
Caseins				
Effekt von stark basischen	Hemmung	Aktivierung		
Proteinen auf die Phosphorylase-				
Phoshatase-Aktivität				
Effekt von Heparin auf die	Hemmung	Kein Effekt		
Phosphorylase-Phosphatase-		oder		
Aktivität		Aktivierung		
Effekt von P-Nitrophenylphosphat	Aktivierung	Hemmung		
auf die Phosphorylase-				
Phosphatase-Aktivität				

Referenzen:

(Agostinis et al., 1987; Bialojan und Takai, 1988; Erdodi et al., 1985; Goris und Merlevede, 1988; Ingebritsen et al., 1983; Pelech und Cohen, 1985; Scott und Schlender, 1988; Stewart et al., 1983; Usui et al., 1988)

Die einfachste Möglichkeit der Unterteilung ist die der Aktivierbarkeit durch divalente Kationen. Die Aktivität von PP2B und PP2C ist abhängig von Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup>, wohingegen die PP2A wie auch die PP1 katalytisch spontan aktiv sind (Cohen, 1989). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der PP2A und ihrer Regulation im Herzen. Die PP2A ist ein zell- und substratspezifisches trimeres Holoenzym, bestehend aus einer strukturellen (A), regulatorischen (B) und katalytischen (C) Untereinheit (Abbildung 2).



Abbildung 2: Proteinphosphatase 2A (PP2A). Die Proteinphosphatase 2A besteht aus 3 Untereinheiten, einer strukturellen (A), regulatorischen (B) und katalytischen (C) Untereinheit. Jede Untereinheit besteht außerdem noch aus verschiedenen Subtypen (Janssens und Goris, 2001).

Sie repräsentiert ungefähr die Hälfte der gesamten zellulären Serin/Threonin-Phosphatase-Aktivitäten. Die C-Untereinheit ist trotz der großen Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz im katalytischen Zentrum zu den C-Untereinheiten anderer Proteinphosphatasen durch ihren C-Terminus einzigartig. Es existieren 2 Isoformen katalytischer Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , deren Aminosäuresequenzen zu etwa 97% identisch sind (Arino et al., 1988). Die A-Untereinheit kommt ebenfalls in 2 unterschiedlichen Isoformen vor: PR65a und PR65B. Diese Isoformen bestehen aus 15 Aminosäureabschnitten, die sich Heat-Sequenzen nennen und die sich immer wiederholen (Groves et al., 1999). Die Bezeichnung HEAT leitet sich von Proteinen ab, in denen diese Struktur bisher gefunden wurde, nämlich Huntingtin, Elongationsfaktor, A-Untereinheit der PP2A und TOR-Kinase (Virshup, 2000). Die strukturelle A- und die katalytische C-Untereinheit bilden zusammen als Heterodimer das Core-Enzym der PP2A. In dieser Form erscheint rund ein Drittel der PP2A (Kremmer et al., 1997). Das Heterodimer stellt die Anlagerungsstelle für die regulatorische, stark gewebespezifische B-Untereinheit dar. Diese Untereinheit ist sehr heterogen und weist 4 Genfamilien (B, B', B'', B''') auf. Alle B'-Isoformen (auch als B56 aufgrund ihres Molekulargewichts im SDS-Gel bezeichnet) sind in unterschiedlicher Expression und Lokalisation im Herzen vorhanden. B56 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\varepsilon$  sind im Zytoplasma lokalisiert, B56 $\gamma$  und  $\delta$  im Zellkern (McCright et al., 1996). Es gibt bei all diesen B56-Isoformen keine Unterschiede in der Verteilung zwischen Vorhof und Ventrikel (Degrande et al. 2013). Im Herzen werden die Isoformen B56α, B56γ3 (Csortos et al., 1996) sowie B56δ vorwiegend exprimiert (McCright et al., 1996). Trotz unterschiedlicher Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen lagern sich alle B-Isoformen an derselben Stelle der strukturellen A-Untereinheit an. Es kann jedoch immer nur eine regulatorische Untereinheit pro PP2A-Trimer binden. Diese bestimmt wiederum die Substratspezifität und Aktivität der PP2A (Agostinis et al., 1992). Unter Berücksichtigung aller möglichen Kombinationen kann es zur Bildung von über 75 unterschiedlichen PP2A-Holoenzymen kommen (Janssens und Goris, 2001).

Bisher ist bekannt, dass die PP2A im Herzen an der Regulation des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs, der Kalzium-Homöostase des SR, der Kontraktilität/Relaxation und der Modulation von Ionenkanal-Aktivitäten beteiligt ist. Dieses geschieht durch die PP2A-induzierte Dephosphorylierung von cTnI, Phospholamban, dem Ryanodinrezeptor sowie dem L-Typ Kalzium-Kanal (Davare et al., 2000; Liu und Hofmann, 2003; Marx et al., 2000). Die Aktivität des PP2A-Heterotrimers wird wiederum durch den Expressionsgrad und die Funktionalität der in Kardiomyozyten vorhandenen B56 $\alpha$ -Untereinheit bestimmt. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von B56 $\alpha$  im Herzen zu einer vermehrten Dephosphorylierung unterschiedlicher Myoproteine wie z.B. von cTnI, vom Myosin bindendes Protein C (MyBP-C), von der Myosinleichtkettenkinase 2 (MLC-2) und vom Troponin T (TnT) führt. In der Summe dieser Effekte kommt es zu einer gesteigerten myofilamentären Kalzium-Sensitivität (Kirchhefer et al., 2014b).

# **1.3 Beeinflussung der PP2A-Aktivität durch Carboxymethylierung und Phosphorylierung ihrer regulatorischen** Untereinheiten

Die Regulation der PP2A erfolgt sowohl durch Carboxymethylierung als auch Phosphorylierung. Die Methylierung des C-terminalen Leucin-Restes (TPDYFL), katalysiert durch die Methyltransferase, bewirkt einen Anstieg der PP2A-Aktivität (Lee et al., 1996). Dies erfolgt durch eine stärkere Bindung der strukturellen A-Untereinheit an die methylierte katalytische C-Untereinheit. Ursprünglich besitzt die nicht methylierte Form C-terminal eine stark negativ geladene Säuregruppe, in der sich das Leucin (Leucin-309) befindet. Durch die Methylierung des Leucins-309 kommt es zu einer Neutralisierung der Ladung und damit zu

einer verstärkten Bindungsaffinität zwischen der A- und der C-Untereinheit (Cho und Xu, 2007).

Neben der Methylierung kann die PP2A-Aktivität durch verschiedene Phosphorylierungen moduliert werden. Reversible Proteinphosphorylierung ist ein bedeutender Mechanismus zur Regulation zellulärer Funktionen. Der Grad der Phosphorylierung resultiert aus einem Zusammenspiel von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (DePaoli-Roach et al., 1994). Die katalytische Untereinheit der PP2A kann durch tyrosinspezifische Proteinkinasen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung findet ausschließlich an Tyrosin-307 (TPDYFL) statt und wird unter anderem durch epidermal growth factor-Rezeptor und Insulin-Rezeptor gekoppelte Tyrosinkinasen katalysiert. Durch die Phosphorylierung wird die PP2A-Aktivität gesenkt (Chen et al., 1992). Außerdem kann PP2A durch eine C-Untereinheit autophosphorylierte-aktivierte Proteinkinase am Threonin-Rest der phosphoryliert werden. Dadurch wird die enzymatische Aktivität gehemmt (Guo und Damuni, 1993). Eine Beeinflussung der PP2A-Aktivität kann nicht nur über die Methylierung und Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit, sondern auch über eine Phosphorylierung der strukturellen A-Untereinheit und der regulatorischen B-Untereinheiten durch Serin/Threonin-Proteinkinasen erfolgen. So erfolgt die Phosphorylierung der PR65A-Untereinheit an Serin-303, Threonin-268 sowie an Serin-314, was zur Aktivitätsminderung der PP2A führt (Kotlo et al., 2014). Eine weitere Phosphorylierungsstelle der B56α-Untereinheit befindet sich am Aminosäurerest Serin-41. Diese wird durch PKCa phosphoryliert (Abbildung 3). Ihre Phosphorylierung von B56a bewirkt eine zusätzliche negative Ladung des Proteins, was zu einer schwächeren Bindung des Substrates zum Holoenzym und damit zu einer verminderten Dephosphorylierung durch die PP2A führen könnte. Die PKCa-abhängige Phosphorylierung von B56a reguliert wiederum die Kalzium-Freisetzung aus dem ER und kann durch PP2A selbst wieder umgekehrt werden (Kirchhefer et al., 2014a).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der PP2A-Regulation durch PKC-abhängige Phosphorylierung von B56 $\alpha$ . Durch Phenylephrin (PE) wird die G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelte Signalkaskade aktiviert. Durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) gespalten. IP<sub>3</sub> aktiviert den Ryanodinrezeptor (RYR) durch Phosphorylierung. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol. DAG hingegen aktiviert, ebenso wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), die Proteinkinase C, die dann den Serin-41 (S<sup>41</sup>)-Rest an der B56 $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert und damit die PP2A inhibiert. A $\alpha$  und C $\alpha$  bilden als strukturelle und katalytische Untereinheit gemeinsam mit der regulatorischen B56 $\alpha$ -Untereinheit die aktive PP2A (modifiziert nach Kirchhefer et al., 2014a).

Gegenstand dieser Arbeit soll die pharmakologische Stimulation der im Herzen exprimierten PKC $\alpha$  sein. Die PKC $\alpha$  gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Die Familie der PKC weist eine hohe Heterogenität auf und lässt sich anhand ihrer Regulation, Stimulierbarkeit und ihrer Aminosäuresequenz in mindestens 11 Subtypen unterteilen ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota/\lambda$ ; Coussens et al., 1986; Ono et al., 1987; Osada et al., 1990; Parker et al., 1986). Diese Subtypen unterscheiden sich durch ihre zelluläre Lokalisation, Substrate sowie Aktivierbarkeit durch Cofaktoren voneinander. Die PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$  gehören zu den konventionellen PKCs und werden unter Kalzium-abhängigen Bedingungen durch Phosphatidylserin aktiviert. Außerdem können diese auch Diacylgycerol (DAG) binden, was sowohl die Affinität für Kalzium als auch die Spezifität für Phosphatidylserin erhöht (Takai et al., 1979). Die PKC  $\delta$ , e,  $\eta$ ,  $\theta$  gehören zur Gruppe der neuen PKCs und sind Kalzium unabhängig, aber ebenfalls wie die konventionellen PKCs durch PMA und DAG in Gegenwart von Phosphatidylserin aktivierbar (Ono et al., 1988). Die atypischen PKCs wie

PKCζ und  $\lambda$  sind entweder durch Kalzium oder durch PMA oder DAG nicht regulierbar (Ono et al., 1989).

Die Aktivierung der PKC $\alpha$  findet mit Hilfe der  $\alpha$ -adrenergen, G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionskaskade statt (Abbildung 3). Die Guanylnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine), welche an Adrenozeptoren binden, bestehen meist aus einer  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit, wobei die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheit sich zu einer stabilen  $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammenlagern. Im Herzen kann man aufgrund von Aminosäuresequenz und nachgeschalteter intrazellulärer Signaltransduktionskaskade zwischen G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> unterscheiden. G<sub>i</sub>-Proteine sind inhibitorische G-Proteine, G<sub>q</sub>-Proteine sind Phospholipase Cgekoppelte G-Proteine und G<sub>s</sub>-Proteine sind an der Aktivierung der Adenylylcyclase beteiligt. Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden sich im Herzen vor allem die Adrenozeptoren. Zu diesen gehören sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Adrenozeptoren. Einer Aktivierung der PKC geht die Aktivierung der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-gekoppelten Signaltransduktionskaskade über ein heterotrimeres G<sub>q</sub>-Protein voraus (Graham et al., 1996). Zu den  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonisten gehören vor allem Adrenalin und Noradrenalin, aber auch das zum Adrenalin strukturanaloge Phenylephrin (Abbildung 4).



Phenylephrin

Adrenalin

Abbildung 4: Strukturformeln von Phenylephrin und Adrenalin. Phenylephrin und auch Adrenalin weisen eine sehr hohe Strukturähnlichkeit auf und können daher an die gleichen Rezeptoren binden.

Die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade beginnt mit der Bindung eines  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonisten (z.B. Phenylephrin) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Es kommt zur G<sub>q</sub>-Protein-vermittelten Signalweiterleitung und dadurch zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die PLC katalysiert wiederum die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und DAG (Kohl et al., 1990). IP<sub>3</sub> lagert sich an Rezeptoren am SR an, und es kommt zur Kalziumfreisetzung aus dem SR ins Zytosol. Insgesamt gesehen ist dieser Effekt im Herzen nur sehr gering (Vites und Pappano 1990). DAG hingegen ist ein direkter Aktivator der PKC $\alpha$ , welche dann die PP2A-Untereinheit B56 $\alpha$  phosphoryliert (Abbildung 3). Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) wirkt auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu DAG auch als PKC-Aktivator (Abbildung 5).



Abbildung 5: Strukturformeln von Diacylglycerol (DAG) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). DAG und PMA weisen eine sehr hohe Strukturähnlichkeit auf. Der Bereich mit hoher Ähnlichkeit ist mit einem roten Rahmen markiert.

PMA bindet mit hoher Affinität an die PKC und aktiviert diese. Eine kurzzeitige Behandlung mit PMA führt immer zu einer Aktivierung, wohingegen eine länger andauernde Behandlung von etwa 72 Stunden abhängig von der PMA-Konzentration ist. So aktiviert  $10^{-5}$  M PMA bei langzeitiger Exposition die PKC, während eine Konzentration von  $5x10^{-5}$  M die PKC herabreguliert (Li et al., 2001; Liou et al., 2000).

# 2 Fragestellung

Mehrere Studien lassen auf eine pathophysiologische Bedeutung der Proteinphosphatase 2A (PP2A) für die Entstehung von Herzhypertrophie, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Arrhythmien schließen. Es existieren am menschlichen Herzen und verschiedenen Tiermodellen Hinweise darauf, dass eine Veränderung der Expression und/oder Aktivität der PP2A Einfluss auf den Phosphorylierungszustand und damit die Funktionalität von kontraktilen Proteinen, Kalzium-regulierenden Proteinen und Ionenkanälen nimmt. Die Aktivität der PP2A ist wiederum von der Interaktion der einzelnen Untereinheiten des trimeren Holoenzyms abhängig. Dabei scheint der Phosphorylierungsgrad der regulatorischen B-Untereinheiten der PP2A (z.B. Genfamilie B'=B56) eine wichtige Rolle zu spielen, wie zellbiologische und biochemische Untersuchungen zeigen konnten. So ändert sich durch eine Phosphorylierung von B56a mittels verschiedener Serin/Threonin-Proteinkinasen die Aktivität der PP2A mit Folgen auf das zelluläre Kalzium-Handling. Eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ist beispielsweise mit einer Phosphorylierung an Serin-41 von B56a und einer Abnahme der enzymatischen Aktivität assoziiert. Von Interesse ist dabei die erhöhte Phosphorylierung von Serin-41 in Proben insuffizienter menschlicher Herzen mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie. Unklar ist, ob diese Prozesse der PKCabhängigen Regulation der PP2A-Aktivität über den Phosphorylierungszustand der B-Untereinheiten auch unter physiologischen Bedingungen und vermehrter Expression von B56α zu entsprechenden kontraktilen Effekten mit beitragen. Zusammengefasst sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Ändert sich die Kontraktilität von Kardiomyozyten und multizellulären Präparaten unter Stimulation der PKC nach Zugabe von Phenylephrin und/oder PMA?
- 2. Gehen diese Effekte mit Veränderungen der myozellulären Kalzium-Homöostase durch Bestimmung der Kalzium-Transienten einher?
- 3. Sind die funktionellen Effekte auf Kontraktilität und Kalzium-Homöostase mit Veränderungen der PP2A-Aktivität vergesellschaftet?
- Ändert sich der Phosphorylierungsgrad von B56α nach pharmakologischer
  Aktivierung der PKC mit vorgenannten Substanzen?

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Genetisch veränderte Mausmodelle

Für die Generierung einer transgenen Maus mit Überexpression der regulatorischen Untereinheit B56a der PP2A wurde zuerst cDNA aus linken menschlichen Ventrikeln extrahiert (Kirchhefer et al., 2014a). Anschließend wurde die cDNA benutzt, um mit Pfu-DNA-Polymerase und zwei designten Oligonukleotiden ein B56α-Fragment zu amplifizieren. Dieses wurde in einen pJET1-Klonierungsvektor eingesetzt (Kirchhefer et al., 2014b). Nach dem Ausschneiden aus dem Vektor mittels Sall wurde das B56a-cDNA-Fragment in eine Expressionskasette des a-Myosin-Schwerketten-Promotors (aMHC) subkloniert (Gulick et al., 1991). Durch Sequenzierung konnte die Richtigkeit der B56α-cDNA-Sequenz bestätigt werden (GATC GmbH, Konstanz, Deutschland). Auf diesem Wege entstanden zehn transgene B56α-Founderlinien. Von diesen zehn ursprünglichen Linien wurden zwei mit DBA/C3H-Mäusen verpaart. Daraus entwickelte sich unsere eigene Zucht dieser Linie. Für alle Experimente wurden Mäuse im Alter von 10 bis 20 Wochen verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts untergebracht. Sie wurden in Polycarbonat-Käfigen mit Gitterdeckel und Makrolon-Filterhaube in einem offenen Gestellsystem gehalten. In einem Käfig befanden sich bis zu 5 Tiere. Alle Tiere lebten - durch eine Zeitschaltuhr geregelt - in einem konstanten 12-stündigen circadianen Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 23°C. Außerdem standen ihnen jederzeit handelsübliches Labortierfutter von Altromin® sowie Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. 21 Tage postnatal wurden die Welpen abgesetzt und geschlechtsspezifisch getrennt in Kleingruppen gehalten. Sie wurden durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet und genotypisiert.

## 3.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte durch eine konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden. Zuerst wurden 3 Wochen alten Mäusen die Schwanzspitzen entfernt und über Nacht mit 150 µl eines NID-Protease K Gemisches (30:1) bei 55°C geschüttelt (Tabelle 2). Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 95°C gekocht, um die Zellen zu lysieren und die genomische DNA zu extrahieren. Dann wurden

die Proben für 1 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert, woraufhin sich die nun extrahierte DNA im Überstand befand. 3 µl des DNA-haltigen Überstandes wurden mit 47 µl eines Reaktionsmixes versetzt. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

- 27,5 μl H<sub>2</sub>O (steril)
- 3,0 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 10,0 µl 5x Green PCR-Puffer
- 2,0 µl dNTP`s (10 mM)
- 2,0 μl Primer 1: B56α-MHC (8327)
- 2,0 μl Primer 2: B56α-B56α (8769)
- 0,5 µl Taq-Polymerase

Die Basensequenz der verwendeten Oligonukleotide lautet wie folgt: B56α-MHC 8327: 5`-GAC CTC TGA CAG AGA AGC AG-3` B56α-B56α8769: 5`-GCA ATC TCT GAC AGA AAA GCT-3`

Nach dem Pipettieren des Reaktionsmixes wurden die Proben in die PCR–Maschine (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingesetzt und durchliefen das in Tabelle 3 gezeigte Programm zur Generierung des DNA-Fragments (Mullis, 1990). Erwartet wurde eine Fragmentgröße von 480 Basenpaaren (bp). Zum Schluss wurden 25-30  $\mu$ l der Proben zusammen mit 6  $\mu$ l eines 100-bp-Standards und 2 Kontrollen (+/-) auf ein 1% iges Agarose-Gel aufgetragen (Tabelle 4). Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese wurden die amplifizierten DNA-Fragmente in 1xTAE-Puffer (Tabelle 5) für 25 min bei einer Spannung von 200 V ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Probe zu einem transgenen (TG) oder Wildtyp-Tier (WT) gehörte, wurden grundsätzlich eine Positiv- und Negativ-Kontrolle aufgetragen. Durch das zum Agarose-Gel zugegebene Ethidiumbromid, welches sich in die vorhandenen DNA-Strukturen einlagert, fluoreszieren entstehende Fragmente unter UV-Licht. Dadurch konnten die PCR-Produkte im Gel mit Hilfe eines UV-Transilluminators (MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Erwartungsgemäß lagen die Banden der B56 $\alpha$ -überexprimierenden transgenen Tiere bei 480 bp (Abbildung 6).



Band of interest (480 Basenpaare)

**Abbildung 6: Genotypisierung der Mäuse.** Es wurde ein 100 Basenpaar-Standard (L) aufgetragen, um ablesen zu können, wie viele Basenpaare (bp) die amplifizierte DNA-Sequenz besitzt. Daneben wurden die Proben sowie eine Positiv- (+Ktr) und Negativ- (-Ktr) Kontrolle aufgetragen.

# 3.3 Physiologische Messungen

### 3.3.1 Isolation adulter ventrikulärer Kardiomyozyten

Die Isolation von Herzmuskelzellen erfolgte mit Hilfe der sogenannten Langendorff-Methode (Langendorff, 1895), bei der das Herz retrograd perfundiert wird. Die Maus wurde mit 0,5 bar CO<sub>2</sub> getötet. Danach wurde das Herz unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen entnommen, die Aorta in heparinisiertem Perfusionspuffer kanüliert und mit einem Seidenfaden fixiert (Abbildung 7 und 8).



Abbildung 7: Darstellung der korrekt platzierten Kanüle im Herzen.

Abbildung 8: Abbildung eines kanülierten Herzens.

Anschließend wurde das Herz mit 1 ml heparinisiertem Perfusionspuffer gespült und an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Das Herz wurde für 5 min mit einer Flussrate von 2,5 ml/min mit 37,5°C warmem Perfusionspuffer (Tabelle 8) retrograd perfundiert und gespült (Abbildung 9). Danach wurde es für 8:10 min (WT) oder 8:25 min (TG) mit der 37,5°C warmen Enzymlösung (Tabelle 9) bei einer Durchlaufrate von ebenfalls 2,5 ml/min verdaut. Im Anschluss daran wurde das Herz von der Kanüle abgetrennt. In einer mit 1 ml Enzymlösung befüllten Petrischale wurden das rechte und linke Atrium abgetrennt, die Ventrikel zerrupft und in ein 50 ml-Zentrifugationsgefäß überführt. Die Petrischale wurde mit 2,5 ml Stopplösung 1 (Tabelle 10) gespült, die Stopplösung aus der Petrischale wurde dann ebenfalls in das 50 ml-Zentrifugationsgefäß pipettiert und resuspendiert. Das Gefäß wurde zur Phasentrennung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden der Überstand (bis zum Knick im Gefäß) verworfen und 7 ml Stopplösung 2 (Tabelle 11) dazupipettiert. Danach wurde das Zell-Puffer-Gemisch resuspendiert und durch einen Filter in ein neues Gefäß überführt. Mit weiteren 3 ml Stopplösung 2 wurde das erste Röhrchen gespült und ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß überfiltriert. Schließlich wurden die Zelllösung für 1 min bei 500 rpm zentrifugiert, der Überstand (~10 ml) im Anschluss daran verworfen und durch 10 ml Perfusionspuffer ersetzt.



**Abbildung 9: Langendorff-Apparatur.** Aus dem Wasserbad fließt 38°C warmes H<sub>2</sub>O durch die Leitungen zum Wärmeaustauscher und umspült die zur Kanüle führende Spule. Außerdem fließt das Wasser zum Füllgefäß und erwärmt so die darin enthaltene Lösung. Die Lösung aus dem Füllgefäß fließt bei Öffnung des Dreiwegehahns mit einer durch die Laborschlauchpumpe regulierten Geschwindigkeit über eine Spule zum Herzen.

Im Anschluss an die Isolation der Kardiomyozyten wurden diese durch Milieu-Umstellung langsam an eine 1 mM-Kalziumkonzentration angepasst. Dies geschah in 5 Schritten mit jeweils 5 minütiger Inkubationszeit zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen. Erst wurden 2 x 50  $\mu$ l 10 mM CaCl<sub>2</sub> hinzupipettiert, dann 100  $\mu$ l 10 mM CaCl<sub>2</sub>, um im Anschluss daran erst 30  $\mu$ l und dann 50 $\mu$ l 100 mM CaCl<sub>2</sub> hinzuzufügen.

#### 3.3.2 Bestimmung der myozellulären Kalzium-Transienten

Die Messung des intrazellulären Kalzium-Transienten (Abbildung 10) erfolgte mit Hilfe des membranpermeablen fluoreszierenden Racemat-Farbstoffes Indo-1/AM (Grynkiewicz et al., 1985), der direkt nach Eintritt in die Zelle durch unspezifische Esterasen hydrolytisch in die membranimpermeable Form umgewandelt wird (Tsien, 1981; Tsien et al., 1982). Das Monitoring des Signals erfolgte durch Anwendung eines dualen Emissions-Photometrie-Systems, kombiniert mit einer CCD-Kamera (Myocyte Calcium and Contractility Recording System, IonOptix, Westwood, USA) sowie mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Nikon (Tokio, Japan). Indo-1 hat sein natürliches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 330-350 nm. Gemessen wurden sowohl Kalzium in freier Form bei einer Wellenlänge von 495 nm als auch gebundenes Kalzium bei einer Wellenlänge von 405 nm (Abbildung 11). Das Signal, im Folgenden als Kalzium-Transient bezeichnet, wurde anhand des Quotienten aus 405/495 nm als relative Kalziumkonzentration ausgedrückt (Takahashi et al., 1999).



**Abbildung 10: Graphische Darstellung eines Kalziumtransienten.** Der Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration beginnt während der Diastole mit einem basalen Kalziumgehalt und steigt nach elektrischer Stimulation bis auf einen systolischen Maximalpeak an, um dann wieder langsam abzuflachen. Gemessen wurde der maximale Kalziumanstieg in Form der Peakamplitude sowie die Zeit bei 50% des Kalziumabfalls (T to BL<sub>50</sub>).



Abbildung 11: Fluoreszenz-Spektren von Indo-1 bei unterschiedlicher Kalzium-Konzentration. Kalziumionen binden an Indo-1. Dadurch verschiebt sich bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm das Fluoreszenz-Emissionsmaximum des Farbstoffs von 495 nm (freies Kalzium) auf 405 nm (gebundenes Kalzium). Dies ist der Grund dafür, dass eine ratiometrische Kalziummessung möglich ist. Die Zahlen an den Kurven sind die freien Kalziumionenwerte in  $\mu$ M (modifiziert nach lifetechnologies Product Information, 2011).

Parallel zur Kalzium-Transientenmessung wurde an den isolierten Kardiomyozyten die Sarkomerlängen-Verkürzung gemessen (Abbildung 12). Dabei wurden anhand der CCD-Kamera und einem Video-Edge-Detection-System die hell/dunkel-Kontrastunterschiede der Sarkomere erfasst.



**Abbildung 12: Graphische Darstellung der Sarkomerlängen-Verkürzung.** Der Verlauf der Sarkomerlängen-Verkürzung beginnt während der Diastole (Basal-Linie). Nach Stimulation verkürzt sich die Sarkomerlänge bis auf ein systolisches Maximum (Peakamplitude), um dann wieder langsam zu relaxieren (Abfall). Gemessen wurden die Peakamplitude sowie die Zeit bei sowohl 50% als auch 90% der Relaxation (T to BL<sub>50</sub>/ T to BL<sub>90</sub>).

Nach Zellisolation und anschließender "Kalziumtreppe" wurden 100 µl des erhaltenen Zellkonzentrats mit 25 µl Indolösung (Tabelle 16) im Reaktionsgefäß beladen und 10 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Kardiomyozyten in die mit Tyrode (Tabelle 15) befüllte Messkammer des inversen Mikroskops (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corporation, Tokio, Japan) pipettiert. Nach einer 5-minütigen Ruhephase wurde die Kardiomyozyten bei 0,5 Hz mittels Platin-Elektroden stimuliert. Die Zellen wurden grundsätzlich mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1,5 ml/min perfundiert und waren zu keiner Zeit der Messung älter als 5 Stunden. Der gesamte Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, da Indo-1 bei höheren Temperaturen leicht aus dem Zellinneren austritt. Dies würde wiederum die Messergebnisse verfälschen (Kirchhefer et al., 2007). Die Messung von Kalzium-Transienten und Sarkomerlängenverkürzung erfolgte nicht nur unter basalen Bedingungen, sondern auch nach Stimulation mit verschiedenen pharmakologischen Wirkstoffen.

#### 3.3.2.1 Pharmakologische Beeinflussung durch Gabe von Phenylephrin

Nach dem Erreichen der Steady-state-Phase wurden zuerst Kalzium-Transienten und Sarkomerlängenverkürzung unter basalen Bedingungen an 10 intakten Kardiomyozyten unter Tyrode gemessen. Im Anschluss daran wurden die Parameter in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Phenylephrin (PE,  $10^{-7}-10^{-4}$  M) für 5 min aufgezeichnet. Phenylephrin wurde als indirekter Aktivator der PKC verwendet, um die Wirkung der  $\alpha$ -adrenergen Signalkaskade auf die PKC sowie auf den intrazellulären Kalziumgehalt und die Sarkomerlängenverkürzung untersuchen zu können.

#### **3.3.2.2** Applikation von Phenylephrin nach Vorstimulation mit

#### Phorbol-12-myristat-13-acetat

Nach der Zellisolation und Anpassung der Kalzium-Konzentration wurden 10 ml Zellisolat mit 1 µl 10<sup>-3</sup> M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 60 min vorinkubiert. Dies ergab eine Konzentration von 10<sup>-7</sup> M PMA im Inkubationsbad. Die Vorstimulation erfolgte, um maximal PMA-stimulierte Zellen messen zu können. PMA wurde als direkter Aktivator der PKC verwendet, um einen Vergleich zwischen direkter und indirekter Stimulation des Enzyms treffen zu können. Anschließend wurden 100 µl des mit PMA vorstimulierten Zellisolats mit 25 ul Indolösung (Tabelle 16) beladen. Nach Inkubation für 10 min unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur wurde das Zellisolat in die mit 10<sup>-7</sup> M PMA versetzte Tyrode der Messkammer pipettiert. Die Zellen sanken nun 5 min lang ab. Danach wurde die Messkammer mit einer 10<sup>-7</sup> M PMA-Lösung für 5 min mit einem Durchfluss von 1,5-2 ml/min gespült. Schließlich wurden die Zellen bei 0,5 Hz für 10 min stimuliert und gleichzeitig weiter gespült. Nach weiteren 60 min Inkubation wurden die basalen Werte unter Anwesenheit von 10<sup>-7</sup> M PMA in der Tyrode gemessen. Darauf wurde die Messkammer für 5 min mit Tvrode, die neben 10<sup>-7</sup> M PMA auch 10<sup>-7</sup> M PE enthielt, gespült. Es folgte eine erneute Messung der bereits basal unter PMA gemessenen Zellen. Im Abstand von jeweils 5 min wurde unter Beibehaltung der PMA-Konzentration PE schrittweise bis 10<sup>-4</sup> M erhöht. Abweichend vom beschriebenen Protokoll wurden auch Kalzium-Transienten und Sarkomerlängenverkürzung an isolierten Herzmuskelzellen gemessen, die nach 60-minütiger Behandlung mit PMA für eine weitere Stunde mit 10<sup>-7</sup> M PMA und 10<sup>-5</sup> M PE-haltiger Tyrode in der Kammer gespült wurden. Neben der Konzentrationswirkungskurve (KWK)

wurden außerdem Messungen unter zuerst basalen Bedingungen, dann nach 60-minütiger Vorstimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA und anschließend unter 60-minütiger Kostimulation mit 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA durchgeführt. Die Messungen und Vorbereitungen liefen nach dem gleichen Protokoll zur Messung der KWK ab.

#### 3.3.2.3 Gabe von Phenylephrin und Isoprenalin

Nach dem Erreichen von Steady-state-Bedingungen wurden zuerst Kalzium-Transienten und zelluläre Kontraktion unter 10<sup>-5</sup> M PE in der Tyrode als basaler Ausgangswert bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde eine 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin (ISO)- und 10<sup>-5</sup> M PE-haltige Lösung in die Kammer einlaufen gelassen. Nach weiteren 10-15 min wurden die einzelnen Parameter (s.o.) erneut registriert.

# 3.3.3 Kontraktionskraftmessungen an isolierten linken Vorhöfen im Organbad

Neben der Bestimmung der zellulären Kontraktion mittels Sarkomerlängenverkürzung wurde die Kontraktionskraft auch an multizellulären Präparaten im Organbad (Abbildung 13) gemessen (Böhm et al., 1986). Das Organbad befand sich in einem doppelwandigen Gefäß, welches mit Hilfe von Wasser auf 37°C erwärmt wurde. Die sich im Reservoir befindende Tyrode (Zusammensetzung s. Tabelle 15) wurde durchgehend mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Der linke Vorhof der Mäuse wurde in einer Schale mit kalter Tyrode vorsichtig vom restlichen Herzen getrennt. Dann wurde er mit einem Seidenfaden sowohl an die Reiz-Elektrode als auch an einen Führungsdraht angeknotet. Der Draht war mit dem Kraftaufnehmer (SGAIME France TIM1020) verbunden. Vor dem Beginn des Versuches wurde die Apparatur durch Anhängen definierter Gewichte kalibriert. Sobald der linke Vorhof eingespannt war, erfolgte die Vorspannung des Präparates (Abbildung 14). Dies war wichtig, da laut dem Frank-Starling-Mechanismus die Kontraktionskraft mit zunehmender initialer Faserlänge bis zum Erreichen eines Maximums steigt (Hamilton, 1960).



Abbildung 13: Darstellung eines Organbades. Der linke Vorhof hängt mit jeweils einem Seidenfaden an der Reizelektrode und an einem Draht befestigt im 37°C warmen Organbad.



**Abbildung 14: Frank–Starling-Mechanismus.** Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Muskellänge und Kontraktionskraft (modifiziert nach Kobirumaki-Shimozawa et al., 2014).

Anschließend wurde der linke Vorhof mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Spannung von maximal 60 V und einer Impulsdauer von 5 ms stimuliert. Dann begann die Äquilibrierungsphase, die in der Regel ca. 30 min bis zum Erreichen des "Steady state" dauerte. Sobald sich die Kraft stabilisiert hatte, wurden PE bzw. PE und PMA in das Organbad bis zu einer Badendkonzentration von 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA gegeben. Die Kraftentwicklung wurde jeweils bis zum Erreichen des Maximums aufgezeichnet. Anschließend wurde der linke Vorhof sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, um später noch biochemische Bestimmungen vornehmen zu können. Die Umwandlung der mechanischen Bewegung des Präparates in ein elektrisches Signal geschah mit Hilfe eines Transducers. Es wurden sowohl die entwickelte Kraftamplitude (Abbildung 15) als auch die kinetischen Parameter während der Relaxationsphase registriert.



Abbildung 15: Kontraktionskraft. Nach Gabe von 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA steigt die Kraft schnell bis auf ein Maximum an.

## 3.4 Biochemische Untersuchungen

#### 3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Dieser Assay ermöglicht es, die Proteinkonzentration zu bestimmen, da die Proteine in saurer Lösung einen Komplex mit dem Farbstoff Coomassie-Blau bilden (Bradford, 1976). Dies zieht eine Absorptions-Wellenlängenverschiebung von 465 nm auf 595 nm nach sich. Das bedeutet, dass das Absorptionsspektrum von 465 nm der ungebundenen Form des Farbstoffs bei Komplexbildung mit Proteinen ein Absorptionsmaximum von 595 nm erreicht. Für die Proteinbestimmung wurde zuallererst ein Proteinstandard, der aus 0,1 mg Albumin pro ml ddH<sub>2</sub>O bestand, vorbereitet. Im Anschluss daran wurde eine Verdünnungsreihe aus diesem Standard, einer kommerziellen Farblösung (BioRad Stammlösung) und ddH<sub>2</sub>O im dreifachen Ansatz hergestellt. Die Standardverdünnungsreihe bestand aus 7 Proben, die alle ein gesamtes Endvolumen von 1000  $\mu$ l aufwiesen. Alle Proben enthielten 200  $\mu$ l BioRad-Stammlösung (Hercules, Kalifornien, USA). Hinzu kamen 0  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 60  $\mu$ l, 80  $\mu$ l oder 100  $\mu$ l des Proteinstandards. Die Differenz wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die zu messenden proteinhaltigen Homogenate und Extrakte wurden so verdünnt, dass ihr Proteingehalt etwa im mittleren Bereich der Standardverdünnungsreihe (Abbildung 16) lag. Danach wurden die Verdünnungen der Proben gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden alle Proben im Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 595 nm auf den Nullwert abgeglichen und gemessen.



Abbildung 16: Standard-Protein-Verdünnungskurve. Aufgetragen gegeneinander sind der Proteingehalt in µg auf der X-Achse und die Extinktion auf der Y-Achse. Dargestellt wird der Zusammenhang der Proteinmenge eines standardisierten Proteins (Albumin) und der Extinktionsänderung.

#### 3.4.2 Proteinphosphatase-Assay

Zur Vorbereitung der Proteinhomogenate für den Assay wurden Zellen aus jeweils 2 Herzen isoliert. Beide Zelllösungen wurden im Anschluss daran für mindestens 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment beider Gefäße in 3,8 ml Tyrode (Tabelle 15) gepoolt. Danach wurden 2 Eppendorfgefäße mit einem Fassungsvermögen von je 1,5 ml vorbereitet. In eins dieser Gefäße wurden 30  $\mu$ l 10<sup>-5</sup> M PMA bis auf eine Endkonzentration von 10<sup>-6</sup> M PMA und 30  $\mu$ l 10<sup>-3</sup> M PE bis auf eine Endkonzentration von 10<sup>-4</sup> M PE gegeben.

In das andere Gefäß wurden zur Kontrolle 30 µl DMSO-haltige Tyrode und 30 µl DMSOfreie Tyrode gefüllt. Die Kontrollen wurden sowohl mit als auch ohne DMSO gemacht, da PMA in DMSO gelöst vorlag und somit eine reine DMSO-Wirkung ausgeschlossen werden musste. Im folgenden Schritt wurden in jedes dieser Gefäße 240 µl der Zellsuspension pipettiert und bei 30°C für 60 min inkubiert. Während dieser Phase wurden die Proben mehrfach aufgeschüttelt, um ein Sedimentieren zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die Zellproben für 30 min bei -80°C eingefroren, um alle enzymatischen Reaktionen zu stoppen und anschließend auf Eis wieder aufgetaut. Die Homogenisierung erfolgte für 10 min auf Eis mit einem Ultraschallstab (VirSonic, Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) bei einer Leistung von 130 W. Daran schloss sich eine Zentrifugation der Proben bei 4°C mit 10.000 rpm an. Der Überstand jedes der beiden Eppendorfgefäße wurde auf 4 Aliquots aufgeteilt. Es entstanden jeweils zwei 110 µl-Aliquots, ein 5 µl-Aliquot für die Proteinbestimmung nach Bradford und ein Aliquot mit dem Restvolumen.

Für wurde welches den eigentlichen Assay ein Substrat benötigt, aus Kaninchenskelettmuskulatur gewonnene Phosphorylase b enthielt. Diese wurde mittels Phosphorylase-Kinase unter Verwendung von  $[\gamma-^{32}P]$ -ATP phosphoryliert. Dadurch entstand <sup>32</sup>P]-markierte Phosphorylase (DePaoli-Roach, 1984). Dazu wurden 4 ml Inkubationslösung (Tabelle 19) für 3 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden 6 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung hinzugegeben und das Gefäß für 30 min ins Eisbad gestellt. Anschließend wurde die Lösung für 20 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 4 ml eines Dialysepuffers (Tabelle 20) resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde in einen Dialyseschlauch eingebracht und für 12 h gegen 4 L des Dialysepuffers bei Raumtemperatur dialysiert. Der Puffer wurde ausgetauscht und die Dialyse für weitere 12 h durchgeführt. Das Dialysat wurde bei 4°C gelagert und als Phosphorylase a-Lösung zur Messung der Proteinphosphatase (PP)-Aktivität verwendet. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde bestimmt.

Myokard-Homogenat (10  $\mu$ l), das ggf. zusammen mit dem Phosphatase-Hemmstoff Okadasäure (OA, siehe auch Abbildung 17) vorinkubiert wurde, wurde zur Messung der Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität gerüttelt, anzentrifugiert und für 10 min bei 30°C auf dem Thermoblock inkubiert. OA wurde in einer Konzentration von 3 nM hinzugegeben um zwischen PP1 und PP2A differenzieren zu können (Kirchhefer et al. 2014b). Anschließend wurde die [<sup>32</sup>P]-markierte Phosphorylase *a* (Tabelle 21) im Eisbad hinzugegeben. Es wurde erneut gemischt und anzentrifugiert. Dann folgte eine zwanzigminütige Inkubation bei 30°C. Die Reaktion wurde auf Eis durch Zugabe von 20  $\mu$ l 50 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Außerdem wurden 30  $\mu$ l Rinderalbumin (20 g/l in 0,1 % Natriumazid) hinzugegeben und alles auf dem Rüttler gemischt. Nach 5 min im Eisbad wurden die präzipitierten Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 x g sedimentiert. 70  $\mu$ l des Überstandes wurden im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen.

Die PP-Aktivität wurde bestimmt, indem zuerst die vorhandene Gesamtradioaktivität als Maß für die spezifische Radioaktivität der eingesetzten Phosphorylase *a* ermittelt wurde. Von allen Werten wurde stets die unspezifische Hintergrundradioaktivität abgezogen. Die Enzymaktivität wurde bestimmt, indem die umgesetzte Menge Substrat (in nM), in Bezug auf ein Milligramm Protein im Homogenat pro Minute Reaktionsdauer, bei 30°C ermittelt wurde. Alle Messwerte wurden mit dem Faktor 10/7 multipliziert, um so von den gemessenen 70 µl auf das Gesamtvolumen von 100 µl zu kommen. Dann wurde die spezifische Radioaktivität der Phosphorylase *a* bestimmt.

Spez. Akt.<sub>Phos a</sub> = 
$$\frac{10/7 \text{ x Gesamtradioaktivität (cpm)}}{\text{Phosphorylase a (nmol)}}$$

Schließlich wurde die PP-Aktivität für jede Probe bestimmt, indem der Quotient gebildet wurde.

Dadurch ließen sich die Werte miteinander vergleichen.



Abbildung 17: Okadasäure-Hemmkurve. Die Proteinphosphatase (PP)-Aktivität fällt mit zunehmender Okadasäure-Konzentration. Dargestellt ist PP-Aktivität in Prozent von der Kontrolle. Verglichen wurden Ventrikelhomogenate von Wildtyp (WT)-Mäusen mit denen von B56 $\alpha$ -überexprimierenden transgenen Mäusen (modifizert nach Kirchhefer et al., 2014b).

#### 3.4.3 Bestimmung der PKC-Aktivität

Die PKC-Aktivität wurde in Anlehnung an Yasuda et al. (1990) bestimmt. Dazu wurden Kardiomyozyten nach Standardprotokoll isoliert (3.3.1) und im Anschluß daran aufbereitet (siehe 3.4.2). Die Zelllösungen zweier Isolationen wurden für 10 min in einem 50 ml-Reaktionsgefäß sedimentiert. Anschließend wurden der Überstand verworfen und die Sedimente beider Präparationen in 3,8 ml Tyrode (siehe Bestimmung der myozellulären Kalzium-Transienten) vereint. Danach wurden zwei 1,5 ml-Eppendorfgefäße vorbereitet. In eins dieser Gefäße wurden 30  $\mu$ l 10<sup>-5</sup> M PMA und 30  $\mu$ l 10<sup>-3</sup> M PE gegeben. In das andere Gefäß wurden zur Kontrolle 30  $\mu$ l DMSO-haltige Tyrode und 30  $\mu$ l DMSO-freie Tyrode gefüllt. Im folgenden Schritt wurden in jedes dieser Gefäße 240  $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert und bei 30°C für 60 min inkubiert. Dabei wurden die Proben regelmäßig aufgeschüttelt, um ein Sedimentieren zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die Zellproben für 30 min bei -80°C eingefroren und anschließend auf Eis wieder aufgetaut. Im Anschluss daran wurden sie für 6 x 10 sec mit einem Ultraschallstab (VirSonic®, Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) bei 130 W gekühlt homogenisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g.

5 µg des Überstandes wurden in 100 µl eines Reaktionspuffers gegeben. Dieser enthielt 25 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml PKC-Substrat (Val-Arg-Lys-Arg-Thr-Leu-Arg-Arg-Leu; Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP in An- (stimulierte Probe) und Abwesenheit (nicht-stimulierte Probe) von 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 µg/ml Diacylglycerol und 100 ug/ml Phosphatidylserin (pH=7,4). Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 30°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 500 mM EDTA gestoppt. Von der Inkubationslösung wurden 3 x 30  $\mu$ l auf ein 9 cm<sup>2</sup> großes P81-Zellulosephosphatpapier (Whatman<sup>™</sup> Grade P81 Ion Exchange Cellulose Chromatography Paper, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgebracht. Die Filterblätter wurden für 4 x 5 min mit 75 mM Phosphorsäure gewaschen. Anschließend wurden die Filter getrocknet und die Radioaktivität in einem Packard Liquid Scintillation Analyzer (Canberra-Packard Bioscience, Zürich, Schweiz) gemessen. Durch Entnahme von 10 µl der Lösung wurde die Gesamtradioaktivität ermittelt. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in pmol/mg/min und wurde als Differenz zwischen stimulierter und nicht-stimulierter Aktivität sowohl für die PMA/PE-behandelten als auch Kontrollkardiomyozyten angegeben. Unter den angegebenen Bedingungen zeigte die Kinetik der Reaktion Linearität in Bezug auf Proteinmenge und Inkubationszeit.

#### 3.4.4 Immunpräzipitation

Das Ziel einer Immunpräzipitation ist es, unter Benutzung spezifischer Antikörper einzelne, in der Probe enthaltene Zielantigene zu binden und anzureichern. In diesem Fall wurde ein spezifischer B56α-Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA) in Überständen vorbehandelter und nicht vorbehandelter Zell- und Vorhof-Homogenate eingesetzt.

Einerseits wurden jeweils 4, mit PMA und PE vorbehandelte oder nichtbehandelte tiefgefrorene Vorhöfe zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Tris-Puffer (+PP, 0,5% Triton) hinzupipettiert und mit dem Virsonic<sup>®</sup> für 3 x 10 sec sonifiziert. Die Probe wurde gevortext und anschließend mit 900  $\mu$ l Tris-Puffer (+PP) versetzt. Die Probe wurde für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert. Dieser Überstand wurde für eine weitere Immunpräzipitation eingesetzt.

Andererseits wurden mit PMA und PE vorbehandelte oder nichtstimulierte ventrikuläre Kardiomyozyten von jeweils 2 Wildtyp-Mäusen isoliert. Nach der letzten Zentrifugation (3.3.1) wurde Perfusionspuffer (Tabelle 8), der mit einem Phosphostop- und Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt wurde, hinzugegeben. Im Anschluss daran wurde die Kalzium-Konzentration in der Lösung schrittweise bis auf 1 mM erhöht. Die Proben wurden für 1 min bei 500 rpm zentrifugiert. Die Überstande der beiden Proben wurden danach sofort als Inputkontrolle gepoolt eingefroren. Auf das Pellet einer Probe wurde 1 ml eines 50 mM Tris-Puffers (+PP) (Tabelle 22) pipettiert und das Pellet damit resuspendiert. Die Resuspension wurde anschließend auf das Pellet der zweiten Probe pipettiert und auch dieses dann resuspendiert. Diese Probe wurde in ein 2 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Die Resuspension wurde dann für 6 x 10 sec mit dem Virsonic<sup>®</sup> auf Eis behandelt, um die Zellmembran zu brechen. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 2 ml großes Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Die entweder aus isolierten Zellen oder Vorhofhomogenaten gewonnenen Überstände (etwa 0,5 ml) wurden mit jeweils 50 µl B56α-Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einer Rotierscheibe inkubiert. Am nächsten Tag wurden dann 200 µl einer Protein A-Agarose Bead-Suspension (Millipore, Billerica, USA) für 2 min bei 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet (ca. 100 µl Beads) wurde anschließend zweimal mit jeweils 1 ml 50 mM Tris-Puffer (+PP) gewaschen (Tabelle 22). Danach wurden 2 µl von Kaninchen-IgG (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) als unspezifischer Antikörper hinzupipettiert, damit der B56a-Antikörper nur spezifisch an B56a bindet. Die Beads wurden dann für 1 h bei 4°C auf der Rotierscheibe inkubiert. Anschließend wurde alles dreimal mit Tris-Puffer (+PP) durch repetitive Wasch- und Zentrifugationsschritte gereinigt. Das Überstand-Antikörper-Gemisch wurde jetzt auf die IgG-haltigen Beads gegeben und dieses dann bei 4°C für 2 h auf der Rotierscheibe inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation der Probe für 2 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und als Kontrolle (nicht gebundenes Protein) bei -20°C eingefroren. Das Überstand-Antikörper-Beads-Gemisch wurde im Anschluss zweimal mit 1 ml 50 mM Tris-Puffer (+PP) gewaschen. Final wurden 100 µl 2,5% SDS-Proben-Puffer (Tabelle 23) auf die Probe gegeben und diese dann ebenfalls bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden eine

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für einen Western Blot, eine Coomassie-Färbung und eine ProQ/Sypro Ruby-Färbung mit den Proben durchgeführt.

#### 3.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach dem Auftauen aller Proben wurden je 50  $\mu$ l mit 50  $\mu$ l 5% SDS-Proben-Puffer (Tabelle 24) vermengt. Danach wurden die Mixe bei 95°C für 5 min gekocht. Sie wurden zum Abkühlen für 30 sec auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurden je 30  $\mu$ l der SDS-solubilisierten Proben auf ein Criterion<sup>TM</sup> TGX<sup>TM</sup> Precast-Gel (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) aufgetragen, welches sich in der mit 150 ml 4x konzentrierten Elektrodenpuffer (Tabelle 25) und 450 ml ddH<sub>2</sub>O befüllten Elektrophoresekammer befand. Die Gelelektrophorese wurde zunächst für 10 min bei 80 V gestartet, um die Proben aus den Taschen herauslaufen zu lassen. Anschließend wurde die Spannung auf 160 V nach oben korrigiert, um die Proben der Größe entsprechend aufzutrennen. Nach etwa einer weiteren Stunde war der Vorgang abgeschlossen.

#### 3.4.6 Western Blot

Für den Western Blot wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen, die Fixierungsplatten entfernt und die Kammern vorsichtig abgetrennt. Danach wurde das Gel in einer Wanne mit 5 1 Transferpuffer (42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) zusammen mit einer Whatman-Nitrozellulosemembran (GE Helthcare Life Science, Little Chalfont, UK) (Towbin et al., 1979) und zwei Blottingpapieren (Albet, Hahnemühle FineArt, Dassel, Deutschland) in den Blottingrahmen eingebaut (Abbildung 18).



Abbildung 18: Zusammenbau des Blottingrahmens.

Anschließend wurde der Blottingrahmen in die Blottingkammer eingesetzt und bei 4 Ah transferiert. Durch das angelegte elektrische Feld wanderten die Proteine aus dem Gel in die Nitrozellulosemembran. Durch hydrophobe Wechselwirkungen blieben die Proteine in der Membran hängen und konnten so in einem weiteren Schritt mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

#### 3.4.7 Ponceau-Färbung

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Membran mit einer Ponceau-Lösung (Tabelle 26) gefärbt, um die in der Membran haftenden Proteine sichtbar zu machen. Hierzu wurde die Membran in ein Färbe-Bad mit Ponceau-Lösung gegeben und diese für 5 min unter Schwenken darin belassen. Anschließend wurde die Membran noch 5x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bis sich ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis auf der Membran ergab. Die gefärbte Membran wurde zum Trocknen auf ein Blottingpapier gelegt.

#### 3.4.8 Immunologische Detektion

Aus der getrockneten Membran wurde dann bei Bedarf die gewünschte Bande (z.B. zwischen 50 und 60 kDa für B56α) ausgeschnitten und ein weiteres Mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Um ein unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran mit 5%-iger Milchpulver-Lösung für 1 h geblockt. Im nächsten Schritt wurde der gegen B56α-gerichtete Antikörper (Bethyl, 1:2.000) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Dieser spezifische Antikörper sollte ausschließlich an das membrangebundene Zielprotein binden. Bevor der zweite Antikörper hinzugegeben wurde, wurde die Membran einmal mit Puffer A (Tabelle 27), zweimal mit Puffer C (Tabelle 28) und wieder einmal mit Puffer A für jeweils 5 min gewaschen. Der zweite Antikörper, Kaninchen-IgG-gekoppeltes HRP (Horseradish-Peroxidase), wurde in einem Verhältnis von 1:5.000 auf die Membran gegeben und dann für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper katalysiert eine chemische Reaktion, die zur Entwicklung der Lumineszenz beiträgt (Abbildung 19). Dann wurde die Membran wieder mit den Puffern A und C im bereits beschriebenen Modus gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz mit dem ECL-Kit von Promega (Madison, Wisconsin, USA). Dafür wurde die Membran in die Detektionskammer (Chemidoc MP, Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) eingelegt, mit den Substanzen (Peroxide Solution und Luminol Enhancer Solution) aus dem ECL-Kit im Verhältnis 1:1 vollständig benetzt und mit einer Folie bedeckt. Die Detektion erfolgte mit einem kamerabasierten System (Chemidoc MP). Das Luminol aus dem ECL-Kit wird mithilfe des HRP-Enzyms in seine oxidierte, lumineszierende Form umgesetzt (Abbildung 19).



Abbildung 19: ECL Reaktion. Die Proteine werden mittels eines Blottingverfahrens auf eine Membran überführt. An bestimmte Zielproteine bindet dann zuerst der erste Antikörper. Der zweite Antikörper ist an Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt und bindet an den Komplex aus Zielprotein und spezifischem ersten Antikörper. Das HRP setzt Luminol in seine oxidierte lumineszierende Form um.

#### 3.4.9 Nachweis phosphorylierter Proteine

Zum Nachweis phosphorylierter Proteine wurde zuerst ein Criterion<sup>TM</sup>TGX<sup>TM</sup> Precast-Gel (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) in die dafür vorgesehene Kammer (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) gestellt. Anschließend wurde die Kammer mit 150 ml 4x konzentriertem Elektrodenpuffer (Tabelle 25) und 450 ml ddH2O befüllt. Nach dem Herausziehen des Kamms konnte das Gel beladen werden. Der Marker (Peppermint Stick<sup>™</sup> Phosphoprotein, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurde im Verhältnis 1:6 mit 5%-igem SDS-Proben-Puffer gemischt und 10 µl davon aufgetragen. Von den Proben wurden 30 µl in die Taschen pipettiert. Aufgrund der sehr geringen Probenmenge erfolgte vorher keine Proteinbestimmung. Dann wurde die Gelelektrophorese für ca. 10 min bei 80V gestartet, bis alle Proben aus den Taschen gelaufen waren. Anschließend wurde die Elektrophorese für ca. 60 min bei 160 V fortgesetzt. Nach der Auftrennung der Proben wurden die Deckplatten

entfernt und das Gel zunächst für 60 min unter leichtem Schwenken in 300 ml der Fixierlösung (Tabelle 29) inkubiert. Danach wurde die Fixierlösung erneuert, um diesen Vorgang über Nacht zu wiederholen. Am nächsten Tag wurde das Gel 3x für jeweils 15 min mit 300 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Daraufhin erfolgte die Färbung mit dem ProQ® Diamond-Farbstoff (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). 200 ml der Färbelösung wurden wieder unter leichtem Schwenken für 90 min auf dem Gel belassen. Ab diesem Schritt geschah die weitere Prozedur unter Lichtabschluss. Das Gel wurde mit der Entfärbelösung (Tabelle 30) für weitere 90 min entfärbt. In dieser Zeit wurde die Lösung 2x erneuert. Schließlich wurde das Gel für 2 x 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um es dann im Chemidoc MP (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) zu scannen (Abbildung 21). Dabei wird das mit ProQ Diamond gefärbte Gel innerhalb seines Anregungsspektrums mit unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt und sendet daraufhin Licht über sein Emissionsspektrum aus. Die Höhe der Emissions-Wellenlänge wird von der Strahlungsintensität und der Wellenlänge des Anregungslichtes bestimmt. ProQ Diamond besitzt ein Exzitations-Wellenlängenmaximum von 555 nm und ein Emissions-Wellenlängenmaximum von 580 nm (Abbildung 20). Durch diese Methode wurden alle phosphorylierten Proteine sichtbar, da sich die fluoreszierende ProQ Diamond-Färbung an alle Serin-, Threonin- und Tyrosin-gebundenen Phosphatgruppen anlagert (Invitrogen, 2010).



Abbildung 20: Emissions- und Exzitationsspektren von ProQ Diamond. Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Wellenlänge und der relativen Intensität der Exzitations- und Emissionsspektren von ProQ Diamond (modifiziert nach Invitrogen, 2010).
Nach der Detektion der phosphorylierten Proteine mittels ProQ wurde das Gel erneut für 2 x 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gespült, um anschließend mittels Sypro Ruby®-Färbelösung (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) über Nacht erneut angefärbt zu werden. Dies geschah, um die gesamten Proteine auf dem Gel mittels Fluoreszenz sichtbar zu machen. Am folgenden Tag wurde das Gel für 30 min bei leichtem Schwenken mit der Entfärbelösung (Tabelle 31) entfärbt. Dann wurde es für 2 x 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gespült, um danach erneut gescannt zu werden (Abbildung 21). Das Prinzip der Visualisierung ist vergleichbar mit dem der ProQ Diamond Färbung. Im Gegensatz dazu hat Sypro Ruby zwei Exzitationsmaxima, die bei 280 nm und 450 nm liegen und ein Emissions-Wellenlängenmaximum bei 610 nm.



Abbildung 21: Beispielblot für ProQ Diamond (A) und Sypro Ruby (B). Darstellung einer Detektion nach ProQ Diamond Färbung (A) und Sypro Ruby Färbung (B). Links ist jeweils ein Peppermint Stick Marker (PM) aufgetragen, rechts daneben jeweils 6 bereits zuvor immunpräzipitierte Proben.

### 3.4.10 Gelfärbung mittels Coomassie Brillant Blau

Das Gel wurde nach der SDS-Elektrophorese für 1 h unter Schwenken in die Färbelösung (Tabelle 32) gelegt. Anschließend wurde das Gel für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in der Entfärbelösung (Tabelle 33) geschwenkt. Danach wurde die Entfärbelösung erneuert, um das Gel über Nacht darin schwenken zu lassen. Zum Schluss konnte das Gel fotografiert werden.

### 3.5 Statistik

Alle Werte aus den Versuchsergebnissen der Behandlungsgruppen sind als Mittelwert ± dem zugehörigen Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechnet aus den Einzelwerten, angegeben. Die Abbildungen zeigen jeweils die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern. Statistische Unterschiede innerhalb eines Tieres bzw. einer Tiergruppe zur individuellen Ausgangslage wurden mittels gepaartem TTEST berechnet. Der Vergleich zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen wurde mit Hilfe des ungepaarten TTESTs ermittelt. Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 wurde als signifikant angesehen. Signifikanzen sind sowohl im Text erwähnt als auch in den Abbildungen gekennzeichnet.

### 4 Ergebnisse

Die PKC $\alpha$  ist in der Lage, die PP2A-Aktivität zu modifizieren, indem sie B56 $\alpha$  an Ser<sup>41</sup> phosphoryliert (Kirchhefer et al., 2014a). Dieses Zusammenspiel zwischen PKC und PP2A ist bisher an einer kultivierten Zelllinie gezeigt worden und könnte einen wichtigen Mechanismus zur Regulation wichtiger zellulärer Funktionen darstellen. Diese Studie zielte darauf ab, durch physiologische und biochemische Messungen zu klären, ob und wenn ja wie die PKC $\alpha$  über eine Phosphorylierung von B56 $\alpha$  die PP2A-Aktivität und somit die kontraktile Funktion und/oder das myozelluläre Kalzium-Handling beeinflussen kann.

# 4.1 Einfluss einer Stimulation der PKC auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten und multizellulären Präparaten

# 4.1.1 Einfluss unterschiedlicher PE-Konzentrationen auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten

Um die optimale PE-Konzentration für alle Folgeversuche zu bestimmen, wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) erstellt. Anhand dieser KWK kann die Sarkomerlängen (SL)-Verkürzung und damit die Kraftentwicklung der ventrikulären Kardiomyozyten bei steigender PE-Konzentration gezeigt werden (Abbildung 22). Erkennbar ist, dass es bei Wildtyp-Zellen zu keiner Veränderung der kontraktilen Reaktion kommt, wohingegen die SL-Verkürzung der transgenen Kardiomyozyten ansteigt. Dies geschieht bis zu einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M PE beinahe linear. Bei einer PE-Konzentration von 10<sup>-6</sup> M bis 10<sup>-4</sup> M ist ein signifikanter Unterschied zwischen den ventrikulären Kardiomyozyten der transgenen Tiere zu denen der Wildtypen zu sehen. Der Anstieg bei einer PE-Badkonzentration von 10<sup>-6</sup> M liegt bei den transgenen Kardiomyozyten bei 62%, bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M sogar bei 101%.



Abbildung 22: Phenylephrin-KWK für Sarkomerlängen–Verkürzung. Enzymatisch isolierte und mit Indo-1 beladene ventrikuläre Kardiomyozyten wurden bei einer Stimulation von 0,5 Hz gemessen. Es handelt sich um eine kumulative Messung, bei der die PE-Konzentration im Bad von 0 M über 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M auf 10<sup>-4</sup> M gesteigert wurde. Jede Zelle wurde somit bei jeder dieser Konzentrationen gemessen. Diese Messungen erfolgten simultan zu den Messungen der intrazellulären Kalzium-Transienten. Zu sehen ist die prozentuale Entwicklung der SL-Verkürzung bei steigender PE-Konzentration normiert auf den Basalwert. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Eine Veränderung der Peakamplitude des Kalzium-Transienten ( $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>) mit steigender PE-Konzentration in transgenen B56 $\alpha$ - und Wildtypen-Mäusen ist in Abbildung 23 gezeigt. Die Gabe von PE zeigt bereits bei einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M einen signifikanten Anstieg von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> um etwa 50% in transgenen Kardiomyozyten und ebenfalls um etwa 50% in der Wildtyp-Zelle. Dies entspricht jedoch noch nicht der maximalen Wirkung. Die Steigung flacht bei den höheren PE-Konzentrationen immer weiter ab. Bei einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M PE hat der Wildtyp mit einer Steigerung um 61% sein Maximum erreicht. Das Maximum der transgenen Zelle liegt in dieser Versuchsreihe bei 10<sup>-4</sup> M, da nur bis zu dieser Konzentration getestet wurde. Möglicherweise liegt das Maximum bei einer noch höheren Konzentration. Da es bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M PE jedoch vermehrt zu Arrhythmien





Abbildung 23: Phenylephrin-KWK für  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>. Enzymatisch isolierte und mit Indo-1 beladene ventrikuläre Kardiomyozyten wurden bei einer elektrischen Stimulation von 0,5 Hz gemessen. Es handelt sich um eine kumulative Messung, bei der die PE-Konzentration im Bad von 0 M über 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M auf 10<sup>-4</sup> M gesteigert wurde. Jede Zelle wurde somit bei jeder dieser Konzentrationen gemessen. Zu sehen ist der prozentuale Anstieg der intrazellulären Peakamplitude des Kalzium-Transienten ( $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>) bei steigender PE-Konzentration, Bezug nehmend auf den Basalwert. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Neben der maximalen SL-Verkürzung wurde die Relaxationszeit der Kardiomyozyten bestimmt, indem die Zeit bis zu einem 50% igen Wert des Kontraktionsmaximums ermittelt wird. Die Wildtypzellen weisen, wie Abbildung 24 zeigt, unter PE-Stimulation keinerlei Veränderungen der Zeit bis zum 50% igen Abfall der maximalen SL-Verkürzung auf. Die Kardiomyozyten der transgenen Tiere reagieren im Kontrast dazu schon ab einer PE-Konzentration von 10<sup>-7</sup> M mit einem Abfall der Relaxationszeit um 30%. Bei einer PE-Konzentration von 10<sup>-4</sup> M fällt die Zeit sogar auf unter 50% des Ausgangswertes ab.



**Abbildung 24: Phenylephrin-KWK für 50%igen Abfall der SL-Verkürzung.** Mittels Liberase isolierte Kardiomyozyten aus Ventrikeln wurden mit Indo-1 beladen, stimuliert (0,5 Hz) und kumulativ mit PE-Konzentrationen im Bad von 0 M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M und 10<sup>-4</sup> M gemessen. Die Konzentrationen im Bad wurden langsam gesteigert, so dass jede Zelle bei jeder dieser Konzentrationen untersucht wurde. Zu sehen ist die prozentuale Veränderung der Abfallzeit der SL-Verkürzung um 50% bei unterschiedlichen PE-Konzentrationen. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Die Abfallzeit von  $[Ca]_i$  bis auf 50% des Ausgangswertes spiegelt die Daten zur myozellulären Relaxation teilweise wider. Aus Abbildung 25 ist zu ersehen, dass dieser Parameter in Wildtyp-Herzmuskelzellen zuerst ansteigt, um dann schließlich bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M PE wieder auf 98% des Basalwertes abzusinken. Die Zeit bis zum 50% igen Abfall der Kalzium-Transienten der transgenen Kardiomyozyten hingegen fällt ab einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M PE um 5% ab. Diese unterschiedliche Entwicklung der 50% igen Abfallzeit führt bei einer PE-Konzentration von 10<sup>-5</sup> M zu einem signifikanten Unterschied zwischen B56α-überexprimierenden und Wildtyp-Zellen.



Abbildung 25: Phenylephrin-KWK für Kalzium-Transientenabfall von 50%. Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden nach der enzymatischen Isolation mit Indo-1 beladen und bei einer Stimulation von 0,5 Hz gemessen. Diese Messung erfolgte kumulativ, bei der die PE-Konzentration im Bad von 0 M über  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M auf  $10^{-4}$  M gesteigert wurde. Somit konnte jede Zelle bei jeder dieser Konzentrationen gemessen werden. Gezeigt wird die prozentuale Veränderung für den Abfall des intrazellulären Kalziums ([Ca]<sub>i</sub>) um 50% nach unterschiedlichen Konzentrationen an PE. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Im Verhältnis der Peakamplitude von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> und SL-Verkürzung wird deutlich, dass die Zellen unter 10<sup>-5</sup> M PE mit einem höheren Ausgangswert für beide Parameter im Vergleich zu unbehandelten Zellen starten. Abgesehen davon kommt es bei den PE-stimulierten Zellen, im Gegensatz zu den unter basalen Bedingungen gemessenen Zellen, erst bei einem viel höheren  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>-Wert zur Relaxation. Dies führt gleichzeitig zu einer Abflachung der Steigung im Endbereich der Kurve, was auf eine verringerte Kalzium-Sensitivität hinweisen könnte (Abbildung 26, Spurgeon et al., 1992).



Abbildung 26: Kalzium-Sensitivität von Wildtyp-Kardiomyozyten unter basalen und stimulierten (10<sup>-5</sup> M PE) Bedingungen. Gemessen wurden 60 Zellen aus 8 Tieren. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Sarkomerlängen (SL)-Verkürzung zum intrazellulären Kalziumgehalt ([Ca]<sub>i</sub>).

## 4.1.2 Einfluss von Phenylephrin (PE) und Isoprenalin (ISO) auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten

Phenylephrin ist ein Agonist an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren. Um auszuschließen, dass die kontraktile Reaktion der Zellen auf Phenylephrin nicht durch zusätzliche Effekte mittels Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren verursacht wird, wurden die Zellen zuerst mit PE und anschließend mit Isoprenalin (ISO) behandelt. Sowohl die SL-Verkürzung (Abbildung 27) als auch die Peakamplitude der Kalzium-Transienten (Abbildung 28) steigen nach ISO-Behandlung sowohl in transgenen als auch Wildtypzellen an. Der Anstieg der SL-Verkürzung in der Wildtypzelle liegt bei 440%. Eine ISO-Behandlung der transgenen Zellen hat eine schwächere Reaktion zur Folge. Hier kommt es lediglich zu einem Anstieg von 125%. Die zusätzliche Gabe von ISO zeigt beim transgenen Tier einen stärkeren Effekt auf  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> als beim Wildtyp-Tier. Der Anstieg im transgenen Modell beträgt 916%, der in den Wildtyp-Kardiomyozyten lediglich 258%.



**Abbildung 27: SL-Verkürzung unter Phenylephrin mit und ohne Isoprenalin-Gabe.** Jede der enzymatisch isolierten und mit Indo-1 beladenen Zellen wurde sowohl basal unter Stimulation mit 10<sup>-5</sup> M Phenylephrin (PE) als auch unter Applikation von 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin (ISO) gemessen. Illustriert ist die prozentuale Entwicklung der SL-Verkürzung nach ISO-Gabe. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)



Abbildung 28: Maximale intrazelluläre Peakamplitude der Kalzium-Transienten ( $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>) unter Phenylephrin-Einfluss mit und ohne Isoprenalin-Gabe. Enzymatisch isolierte, mit Indo-1 beladene ventrikuläre Kardiomyozyten wurden basal bei einer PE-Badkonzentration von 10<sup>-5</sup> M gemessen. Anschließend wurden dieselben Zellen in einer Badkonzentration von 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin (ISO) gemessen. Ermittelt wurde die prozentuale Entwicklung von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> nach Zugabe von ISO. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Parallel zu den Messungen unter alleiniger Gabe von PE wurde auch hier die Abfallkinetik für SL-Verkürzung und Kalzium-Transienten gemessen. Die Zeiten bis zu einem 50% igen bzw. 90% igen Abfall der SL-Verkürzung haben unter ISO und PE eine Differenz in beiden Gruppen (Abbildung 29 und 30). Es kommt ebenfalls im Abfall der Kalzium-Transienten um 50% zu einem Unterschied zwischen der Gruppe mit alleiniger Phenylephrin- und kombinierter PE/ISO-Behandlung. Zusätzlich wird deutlich, daß sowohl bei den Relaxationszeiten als auch beim Abfall der Kalzium-Transienten die transgenen Kardiomyozyten eine schwächere Reaktion auf die pharmakologische Intervention mittels PE und ISO im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zeigen (Abbildung 31).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kombination von PE mit ISO einen zusätzlichen Effekt auf die Zellen hat. Dies lässt auf eine vorrangige Wirkung des PE auf die  $\alpha$ -adrenerge Signalkaskade schließen, wobei der Effekt bei den transgenen Tieren deutlich

schwächer ausgeprägt ist. Dies kann sowohl auf eine Restwirkung von Phenylephrin auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade zurückzuführen sein, als auch eine noch unbekannte Reaktion des Transgens darstellen.



Abbildung 29: Zeit bis zum Abfall der SL-Verkürzung um 50% unter PE mit und ohne Isoprenalin-Applikation. Ersichtlich ist die prozentuale Veränderung für die 50% ige Relaxationszeit nach zusätzlicher ISO-Stimulation im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und transgenen Zellen (TG). (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)



Abbildung 30: Zeit bis zum 90%igen Abfall der SL-Verkürzung unter Phenylephrin mit und ohne Isoprenalin-Gabe. Jede Zelle wurde sowohl unter basaler Stimulation mit 10<sup>-5</sup> M Phenylephrin (PE) als auch unter kombinierter Gabe von PE und 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin (ISO) gemessen. Erkennbar ist die prozentuale Entwicklung des 90%igen Abfalls der SL-Verkürzung unter PE- und ISO-Stimulation in Bezug auf die alleinige Gabe von PE. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)



**Abbildung 31: Zeit bis zu einem [Ca]<sub>i</sub>-Abfall um 50% unter PE mit und ohne Isoprenalin-Gabe.** Jede Zelle wurde sowohl unter basaler Stimulation mit 10<sup>-5</sup> M PE als auch unter PE und 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin (ISO) gemessen. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung für den Abfall des intrazellulären Kalzium-Transienten um 50% nach zusätzlicher ISO-Stimulation. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

# 4.1.3 Einfluss von Phenylephrin (PE) und Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) auf die Kontraktilität und den Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten und Vorhofpräparaten

Da Phenylephrin als Agonist an  $\alpha_1$ -Adrenozezeptoren neben einer Bildung von Diacylglycerol (DAG) auch zu einer Aktivierung des intrazellulären "second messengers" IP<sub>3</sub> zu einer Freisetzung von gespeicherten Kalzium-Ionen und somit verstärkten Kontraktilität führen kann, wurden zusätzliche Versuche mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) durchgeführt. PMA kann im Gegensatz zu PE als Strukturanalogon des Diacylglycerols direkt die PKC aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass bei kombinierter Gabe von PE und PMA die PKC-Aktivität zunimmt (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Basale und maximale PKC-Aktivität.** Dargestellt ist die absolute Aktivität der PKC. Verglichen wird die gemessene Aktivität unter basalen Bedingungen (=nicht-stimuliert) und nach Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA in Homogenaten aus isolierten Wildtyp-Kardiomyozyten. (n, Tierzahl)

Da unter der gemeinsamen Gabe von PE und PMA eine maximale PKC-Stimulation gemessen werden konnte, wurden die funktionellen Effekte an isolierten Kardiomyozyten mittels Messung der SL-Verkürzung und Kalzium-Transienten nicht nur unter PMA, sondern auch nach Gabe von PMA und PE untersucht. Die maximale SL-Verkürzung (Abbildung 33) und die Peakamplitude der intrazellulären Kalzium-Transienten (Abbildung 34) nehmen nach 60-minütiger Stimulation mit  $10^{-7}$  M PMA in den Wildtyp-Zellen um 26% bzw. 69% zu. In Kombination mit  $10^{-5}$  M PE steigen beide Werte sogar noch einmal an. In den transgenen Kardiomyozyten kommt es im Gegensatz dazu durch die Behandlung mit PMA lediglich zu einem Anstieg von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>. Die SL-Verkürzung steigert sich erst bei Zugabe von  $10^{-5}$  M PE. In transgenen Zellen sind die Effekte der SL-Verkürzung deutlich geringer. Diese Beobachtung wird jedoch nicht von den Werten der Effekte auf die Peakamplitude der intrazellulären Kalzium-Transienten reflektiert (Abbildung 33 und 34). Der prozentuale Anstieg der Peakamplitude von [Ca]<sub>i</sub> ist im transgenen Tier und Wildtypen vergleichbar.



**Abbildung 33: SL-Verkürzung unter basalen Bedingungen sowie nach Stimulation mit PMA und PMA+PE.** Dargestellt ist die SL-Verkürzung in Zellen transgener (TG) und Wildtyp-Tiere (WT) unter basalen Bedingungen und nach 60-minütiger Stimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA in An- und Abwesenheit von 10<sup>-5</sup> M PE. Es handelt sich hier um kumulative Messungen. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)



Abbildung 34:  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> unter basalen Bedingungen sowie nach PMA- und PMA+PE-Stimulation. Dargestellt ist der maximale intrazelluläre Kalzium-Transient in basaler Ausgangslage sowie nach 60-minütiger Stimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA in An- und Abwesenheit von 10<sup>-5</sup> M PE in isolierten Kardiomyozyten von Wildtypund transgenen Tieren. Es handelt sich hier um kumulative Messungen, d.h. jede Zelle wurde unter jeder dieser drei Bedingungen gemessen. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Von besonderem Interesse ist die Frage, wie sich eine Vorstimulation der Kardiomyozyten mit PMA auf den Verlauf der PE-KWK auswirkt (Abbildung 35). Das bedeutet, dass die Zielsetzung war, herauszufinden ob die direkte PKC Aktivierung einen Effekt auf die Reaktion einer  $\alpha_1$ -Adrenozeptor Stimulation ausübt. Ohne 60-minütige Vorstimulation (Abbildung 22) kommt es unter ansteigenden Konzentrationen von PE nicht zu einer Veränderung der SL-Verkürzung in Wildtyp-Kardiomyozyten, wohingegen eine PMA-Vorstimulation bei einer Stimulation mit 10<sup>-5</sup> M PE zu einer Steigerung dieses Parameters um 28% führt. Die SL-Verkürzung im transgenen Tier wird dagegen nach einer 87%igen Steigerung unter alleiniger PE-Applikation durch PMA-Vorstimulation unverändert belassen.



Abbildung 35: PE-KWK für SL-Verkürzung unter 60-minütiger Vorstimulation mit PMA. Die Zellen wurden zuerst für 60 min mit 10<sup>-7</sup> M PMA vorstimuliert. Die Auswirkungen dieser pharmakologischen Intervention auf die SL-Verkürzung wurden als basaler Wert gemessen. Anschließend wurde eine PE-KWK (10<sup>-7</sup> M bis 10<sup>-4</sup> M) durchgeführt. Bei jeder PE-Konzentration war 10<sup>-7</sup> M PMA im Bad enthalten. Erfasst ist somit die prozentuale Veränderung der SL-Verkürzung unter PMA und PE-Einfluss, normiert auf den PMA-Ausgangswert. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Zu parallelen Veränderungen kommt es bei der Registrierung der intrazellulären Kalzium-Transienten nach einer Vorstimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA (Abbildung 36). Wie in Abbildung 23 gezeigt wurde, kommt es unter ansteigenden Dosen von PE zu einem Anstieg von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> sowohl in den transgenen als auch Wildtyp-Zellen. Die transgenen Zellen wiesen dabei einen größeren Anstieg von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> zum Ausgangswert auf. Durch die 60-minütige PMA-Vorstimulation und weitere PMA-Gabe während der PE-KWK kommt es in den transgenen Zellen zu einem prozentual schwächeren Anstieg der intrazellulären Peakamplitude von [Ca]<sub>i</sub> als in den Wildtyp-Kardiomyozyten. So kommt es nach PMA-Vorstimulation zu einem Anstieg von 99%, im Gegensatz zu einer  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>-Zunahme von nur 61% unter alleiniger Gabe von PE von 10<sup>-5</sup> M. Der Anstieg von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> ändert sich dagegen beim transgenen Tier nicht. Es bleibt bei einer Zunahme von 86%.



Abbildung 36: PE-KWK für  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> unter 60-minütiger PMA-Vorstimulation. Veranschaulicht ist die maximale intrazelluläre Peakamplitude der Kalzium-Transienten sowohl unter 60-minütiger Vorstimulation mit  $10^{-7}$  M PMA als auch während einer PE-KWK. Die PE-KWK wurde von einer Gabe von  $10^{-7}$  M PMA begleitet, d.h. bei jeder PE-Konzentration war außerdem  $10^{-7}$  M PMA im Bad enthalten. Es handelt es sich um eine kumulative Messung. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Nicht nur die maximale intrazelluläre Peakamplitude der SL-Verkürzung, sondern auch die Zeit bis zum 50%igen Abfall der myozellulären Kontraktilität zeigen in Wildtyp-Zellen ein anderes Bild als bei fehlender PMA-Vorstimulation. Die Zeit bis zur 50%igen Relaxation nach 60-minütiger PMA-Vorstimulation verkürzt sich bis zu einer PE-Konzentration von 10<sup>-5</sup> M um 22% in den Wildtyp-Zellen (Abbildung 37). Dieser Effekt bleibt bei fehlender PMA-Vorstimulation aus (Abbildung 24). In Zellen transgener Tiere kommt es nach PMA-Vorstimulation ab einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M PE zu einer Verkürzung der halbmaximalen Relaxationszeit um 25%. Insgesamt ist in den transgenen Zellen das Ausmaß einer Beschleunigung der 50%igen Relaxationszeit unter Vorstimulation mit PMA geringer als bei alleiniger Gabe von PE ausgeprägt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Effekten zur maximalen SL-Verkürzung.



**Abbildung 37: PE-KWK für den halbmaximalen Abfall der SL-Verkürzung nach PMA-Vorstimulation.** Dokumentiert ist die prozentuale Veränderung des 50% igen Abfalls der SL-Verkürzung unter verschiedenen Bedingungen. Beim Ausgangswert handelt es sich um die Daten nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit 10<sup>-7</sup> M PMA. Die folgenden Werte wurden unter aufsteigenden PE-Konzentrationen in kontinuierlicher Anwesenheit von 10<sup>-7</sup> M PMA erhoben. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Das Ausmaß einer Beschleunigung der 90%igen Relaxation (Abbildung 38) ist mit dem der halbmaximalen Relaxation (Abbildung 37) in den Wildtyp-Kardiomyozyten vergleichbar. Schon bei einer PE-Konzentration von 10<sup>-7</sup> M verringert sich die Relaxationszeit in der Wildtyp-Zelle um 13%. Bei einer Badkonzentration von 10<sup>-5</sup> M PE ist der Parameter auf unter 80% des Ausgangswertes unter alleiniger PMA-Gabe gesunken. In den transgenen Zellen kommt es erst ab einer PE-Badkonzentration von 10<sup>-5</sup> M zu einer veränderten Reaktion im Vergleich zum Ausgangswert. Bei einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M PE ist die Abnahme der Relaxationszeit in den transgenen Zellen darüber hinaus geringer als in den Wildtyp-Kardiomyozyten.



Abbildung 38: PE-KWK für die 90% ige Relaxation nach PMA-Vorstimulation. Kardiomyozyten aus transgenen und Wildtyp-Tieren wurden bei einer Stimulation von 0,5 Hz gemessen. Es handelt sich um eine an eine 60-minütige Vorstimulation mit  $10^{-7}$  M PMA angeschlossene kumulative Messung, bei der die PE-Konzentration im Bad von 0 M über  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M auf  $10^{-4}$  M gesteigert wurde. Während aller Messungen befand sich zusätzlich immer  $10^{-7}$  M PMA im Bad. Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der Relaxationskinetik. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Vergleichbare Veränderungen der Kinetik wurden auch für die Kalzium-Transienten beobachtet. So kommt es unter alleiniger PE-Stimulation zu einer Verlangsamung der Abfallkinetik bis zu einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M, um dann wieder auf den Ausgangswert zu kommen (Abbildung 25). Nach PMA-Vorstimulation ergibt sich jedoch bei einer Konzentration von PE 10<sup>-5</sup> M eine Beschleunigung der halbmaximalen Abfallzeit der Kalzium-Transienten um 9%. In den transgenen Kardiomyozyten kommt es zu einer vergleichbaren Beschleunigung der 50%igen Abfallzeit von [Ca]<sub>i</sub> von 7% (Abbildung 39).



Abbildung 39: PE-KWK für den halbmaximalen Abfall von  $[Ca]_i$  nach Vorstimulation mit PMA. Enzymatisch isolierte und mit Indo-1 beladene ventrikuläre Kardiomyozyten wurden bei einer Stimulation von 0,5 Hz gemessen. Es handelt sich um eine kumulative Messung, bei der die PE-Konzentration im Bad von 0 M über 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M auf 10<sup>-4</sup> M gesteigert wurde bei kontinuierlicher Anwesenheit von 10<sup>-7</sup> M PMA. Jede Zelle wurde erst für 60 min mit 10<sup>-7</sup> M PMA vorstimuliert. Zu sehen ist die prozentuale Entwicklung der halbmaximalen Abfallzeit der Kalzium-Transienten. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Unter den initialen basalen Messungen ändern sich die halbmaximalen Abfallzeiten für SL-Verkürzung und [Ca]<sub>i</sub> unter alleiniger 60-minütiger Applikation von 10<sup>-7</sup> M PMA in den Wildtyp-Zellen nicht (Abbildung 40 und 41). Vergleichbare Effekte wurden auch bei ausschließlicher Gabe von PE für beide Parameter beobachtet (Abbildung 24 und 25). Gibt man jedoch im Anschluss an eine 60-minütige PMA-Vorstimulation 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA hinzu, ergibt sich eine Beschleunigung sowohl für die 50%ige Relaxation als auch den halbmaximalen Abfall der Kalzium-Transienten in den Wildtyp-Herzmuskelzellen (Abbildung 40 und 41). Im Kontrast dazu entwickeln sich die Abfallkinetiken in den Kardiomyozyten der transgenen Tiere anders. Hier zeigen die Zellen sowohl bei 60-minütiger PMA-Stimulation als auch bei kombinierter PMA/PE-Stimulation keine Unterschiede für die halbmaximale Relaxationszeit (Abbildung 40). Die alleinige Gabe von PE verringert jedoch die Relaxationszeit bei einer Badkonzentration von 10<sup>-5</sup> M um über 40% (Abbildung 24). Die Zeit bis zum 50%igen Abfall der Kalzium-Transienten ist dagegen schon nach 60-minütiger Stimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA kürzer im Vergleich zur basalen Ausgangslage (Abbildung 41). Nach kombinierter PMA- und PE-Gabe wird die Abfallkinetik von [Ca]<sub>i</sub> nochmals beschleunigt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die WT-Zellen eine Vorstimulation mit PMA 10<sup>-7</sup> M brauchen, um maximale Effekte sowohl auf die Sarkomerlängen-Verkürzung als auch die Kalziumtransienten zu erzielen. Im Gegensatz dazu spielt dieser Effekt beim transgenen Tier keine Rolle.



Abbildung 40: Zeit bis zum 50% igen Abfall der SL-Verkürzung nach Stimulation mit PMA und anschließender kombinierter Gabe von PMA und PE. Zu Beginn wurden alle Zellen unter basalen Bedingungen gemessen, anschließend wurden diese unter  $10^{-7}$  M PMA studiert, um dann im Anschluss die Relaxationskinetik unter  $10^{-7}$  M PMA und  $10^{-5}$  M PE ermitteln zu können. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)



Abbildung 41: Zeit bis zum 50%igen Abfall von [Ca]<sub>i</sub> nach Stimulation mit PMA und anschließender zusätzlicher Gabe von PMA. Dargestellt ist die halbmaximale Abfallzeit der Kalzium-Transienten unter basalen Bedingungen, unter 60-minütiger Vorstimulation mit 10<sup>-7</sup> M PMA und unter kombinierter Gabe von PMA und 10<sup>-5</sup> M PE. (n/n, Anzahl von Kardiomyozyten/Tierzahl)

Die Relation zwischen [Ca]<sub>i</sub> und der SL-Verkürzung in Wildtyp-Kardiomyozyten zeigt (Abbildung 42), dass die Zellen sowohl unter 10<sup>-7</sup> M PMA als auch unter kombinierter Gabe von PMA und PE unter einer höheren Ausgangslage für beide untersuchten Parameter starten. Die Relaxationsphase läuft in den PMA-behandelten und nicht-stimulierten Kardiomyozyten vergleichbar ab. Unter gleichzeitiger Gabe von PMA und PE flacht die Kurve im Endbereich stärker ab. Aus dieser Kinetik kann geschlossen werden, dass die Kalziumsensitivität der Myofilamente unter PE und PMA Stimulation abnimmt.



Abbildung 42: Verhältnis von intrazellulärem [Ca]<sub>i</sub> zur SL-Verkürzung in Wildtyp-Herzmuskelzellen unter basalen Bedingungen und unter Applikation von sowohl 10<sup>-7</sup> M PMA als auch 10<sup>-7</sup> M PMA und 10<sup>-5</sup> M PE. Erkennbar ist der Zusammenhang zwischen intrazellulärem [Ca]<sub>i</sub> und SL-Verkürzung. Auf der Abbildung sind Daten aus 42 Zellen von 4 Wildtyp-Herzen zusammengefasst. Die Steigung der Kurve in der Endstrecke der Relaxation verändert sich durch Gabe von PMA gegenüber basalen Bedingungen nur gering. Sobald PE hinzukommt, flacht die Steigung noch weiter ab (s.a. Einsatz rechts oben). Diese Entwicklung ist ein Indiz für eine reduzierte Kalzium-Sensitivität (Spurgeon et al., 1992).

Durch Verwendung von linken Vorhöfen sollte getestet werden, ob die in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten beobachteten kontraktilen Effekte sowohl auf multizelluläre Präparate als auch auf andere Regionen des Myokards übertragbar sind. Diese Versuche wurden ausschließlich an Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt, um die durch eine PKC-Aktivierung verursachten kontraktilen Auswirkungen unter physiologischen Bedingungen zu testen. Ferner konnten durch den gewählten Ansatz kompensatorische Mechanismus durch die B56 $\alpha$ -Überexpression ausgeschlossen werden.

Die Kontraktionskraft der linken Atrien (LA) nimmt im Vergleich zur Ausgangslage nach Stimulation mit 10<sup>-5</sup> M PE um 8% und nach Gabe mit 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA um 51% zu (Abbildung 43). Durch eine Steigerung der PE-Konzentration auf 10<sup>-4</sup> M kommt es in Kombination mit 10<sup>-7</sup> M PMA zu einer Zunahme der Kontraktionskraft um 54% im Vergleich zur basal gemessenen Kraft (Abbildung 44).



**Abbildung 43: Kraftmessung der linken Atrien im Organbad.** Grafisch wiedergegeben ist die prozentuale Entwicklung der Kontraktionskraft der linken Atrien von Wildtypen nach Gabe von 10<sup>-5</sup> M PE oder 10<sup>-5</sup>M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA im Vergleich zu basalen Bedingungen. (n, Anzahl der linken Atrien)



**Abbildung 44: Kontraktionskraft der linken Atrien im Organbad.** Dargestellt ist die Entwicklung der Kontraktionskraft linker Vorhofpräparate von Wildtyp-Tieren bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA im Vergleich zu basalen Bedingungen. (n, Anzahl der linken Atrien)

### 4.2 Bestimmung der PP2A-Aktivität unter verschiedenen Stimuli

#### 4.2.1 Stimulation durch Phenylephrin

Im nächsten Abschnitt der Arbeit sollte getestet werden, ob die unter PKC-Stimulation beobachteten Effekte auf Kontraktilität und Kalzium-Homöostase durch eine Beeinflussung der PP2A-Aktivität verursacht werden. Dazu wurden sowohl Überstände aus isolierten ventrikulären Kardiomyozyten als auch linken Vorhöfen unter basalen Bedingungen und pharmakologischer PKC-Aktivierung untersucht.

Die Kardiomyozyten der Wildtyp-Herzen zeigen unter Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE keine Veränderung der PP2A-Aktivität, wohingegen die PP2A-Aktivität in den transgenen Zellen um 30% sinkt (Abbildung 45). Die PP1-Aktivität bleibt sowohl in Wildtyp- als auch transgenen Zellen unverändert.



Abbildung 45: Phosphataseaktivität nach Stimulation mit  $10^{-4}$  M PE. Zuerst wurden enzymatisch isolierte Kardiomyozyten in An- und Abwesenheit von  $10^{-4}$  M PE stimuliert. Anschließend wurde die Proteinphosphatase (PP)-Aktivität in Überständen homogenisierter Herzmuskelzellen in An- und Abwesenheit von 3 nM Okadasäure zur Unterscheidung von PP1- und PP2A-Aktivität gemessen (s. Methodik). Dargestellt sind sowohl die gesamte Proteinphosphatase-Aktivität als auch die Einzelaktivitäten für PP1 und PP2A. (n, Tierzahl)

#### 4.2.2 Stimulation durch PMA

Anders als unter PE-Gabe kommt es unter alleiniger Stimulation der Kardiomyozyten mit 10<sup>-6</sup> M PMA für 60 min zu einer Abnahme der PP2A-Aktivität in den Wildtyp-Zellen (Abbildung 46). Dieser Effekt war unabhängig von der Gesamt- oder PP1-Aktivität. Im Gegensatz dazu bleibt die PP2A-Aktivität nach PMA-Gabe in den transgenen Kardiomyozyten unverändert.



Abbildung 46: Proteinphosphatase-Aktivität nach PMA-Gabe. Die PP-Aktivität wurde an Homogenaten isolierter Kardiomyozyten aus Wildtyp- und transgenen Tieren bestimmt. Die Messungen erfolgten in An- und Abwesenheit von 3 nM Okadasäure, um zwischen PP1- und PP2A-Aktivität unterscheiden zu können. Vor der Messung wurden die enzymatisch isolierten Kardiomyozyten für 60 min mit 10<sup>-6</sup> M PMA inkubiert. (n, Tierzahl)

### 4.2.3 Stimulation durch PE und PMA

Die PP2A-Aktivität wurde auch unter kombinierter Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA bestimmt, da unter diesen Bedingungen eine maximale PKC-Stimulation auftrat (Abbildung 32). Wie unter alleiniger Gabe von PMA gezeigt werden konnte, nimmt die PP2A-Aktivität auch nach Vorstimulation mit PE und PMA in den Wildtyp-Zellen ab (Abbildung 47). Die PP1-Aktivität bleibt dagegen in den Wildtyp-Zellen unverändert. In den transgenen Kardiomyozyten ändert sich nur die Gesamt-Phosphatase-Aktivität, was jedoch nicht auf eine alleinige Änderung der PP1- oder PP2A-Aktivität zurückzuführen ist. Insgesamt ist unter basalen Bedingungen die PP-Aktivität in den transgenen Herzmuskelzellen höher als in denen der Wildtyp-Herzen (s.a. Kirchhefer et al., 2014b).



**Abbildung 47: PP-Aktivität nach Stimulation mit PE und PMA.** Die PP-Aktivität wurde basal und nach einer 60-minütigen Vorstimulation der Kardiomyozyten mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA gemessen. Abgebildet sind sowohl die gesamte PP-Aktivität, die PP1- und PP2A-Aktivität. (n, Tierzahl)

In Homogenaten linker Atrien sinkt die PP2A-Aktivität nach Inkubation mit 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA um 28% im Vergleich zu den basalen Bedingungen ab (Abbildung 48). Dieser Effekt ist mit der Entwicklung der PP2A-Aktivität nach kombinierter PE/PMA-Gabe in den Kardiomyozyten-Homogenaten vergleichbar (Abbildung 47).

Sowohl in ventrikulären Kardiomyozyten als auch in Vorhofhomogenaten ändert sich die PP1 Aktivität nicht. Das zeigt, dass die PKC-vermittelten Effekte auf die PP2A-Aktivität unabhängig von gesamtzellulären Änderungen der PP1 sind. Somit scheint die PP1 keinen Einfluss auf die Interpretation der kontraktilen Daten zu haben.



Abbildung 48: Proteinphosphatase (PP)-Aktivität in linken Atrien nach Inkubation mit PE oder PE mit PMA. Proben aus linken Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen wurden unter basalen Bedingungen sowie nach 60minütiger Behandlung mit entweder 10<sup>-5</sup> M PE oder 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA gemessen. Abgebildet sind sowohl die gesamte PP-Aktivität (Gesamt), die Phosphatase 1-Aktivität (PP1) und die Phosphatase 2A-Aktivität (PP2A). (n, Anzahl linker Atrien)

# 4.3 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von B56α nach pharmakologischer PKC-Aktivierung

Ich konnte bisher zeigen, dass die Gabe von PE und PMA mit einer Steigerung von myofilamentärer Kontraktilität und intrazellulärem Kalzium einhergeht. Diese Effekte waren mit einer Abnahme der PP2A-Aktivität sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch multizellulären Vorhofpräparaten vergesellschaftet. Um zu testen, ob die Abnahme der PP2A-Aktivität entsprechend der eingangs aufgestellten Hypothese auf eine veränderte Phosphorylierung der regulatorischen B56 $\alpha$ -Untereinheit zurückzuführen ist, wurden sowohl Expression als auch Phosphorylierung dieser PP2A-Untereinheit bestimmt. Alle Versuche wurden ausschließlich an Zellen und Vorhofpräparaten von Wildtyp-Mäusen durchgeführt,

um die zellulären Verhältnisse unter physiologischen Bedingungen testen zu können. Zuerst wurde der Grad der Proteinexpression unter basalen und stimulierten Bedingungen unter Anwendung verschiedener Nachweismethoden gemessen. Dazu kam nach Homogenisierung der Proben für die Immunpräzipitation auch ein gegen B56 $\alpha$  gerichteter Antikörper zum Einsatz. Da ein spezifischer Antikörper für die putative Phosphorylierungsstelle Serin-41 derzeit nicht zur Verfügung steht, musste zuerst eine Anreicherung von B56 $\alpha$  mittels Immunpräzipitation erfolgen, um anschließend ausschließlich eine Phosphorylierung dieses Proteins nachweisen zu können. Die Menge an B56 $\alpha$  ändert sich durch Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA im Vergleich zur basalen Ausgangssituation nicht. Dieses Ergebnis konnte in Antikörper-präzipitierten Proben sowohl mittels Coomassie-Färbung (Abbildung 49) als auch in Immunoblots unter Benutzung eines B56 $\alpha$ -spezifischen Antikörpers (Abbildung 50) bestätigt werden.



Abbildung 49: Nachweis der Expression von B56 $\alpha$  in Kardiomyozyten mittels Coomassie-Färbung. Gemessen wurde indirekt die Expression von B56 $\alpha$  in Immunpräzipitaten (anti-B56 $\alpha$ -Antikörper) von Homogenaten aus Wildtyp-Kardiomyozyten. Der Grad der Expression wurde unter Benutzung einer Coomassie-Färbung bestimmt. Prozentual dargestellt ist die relative Expression von B56 $\alpha$  sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA. (n, Anzahl der Kardiomyozytenpräparationen)



Abbildung 50: Nachweis der Expression von B56 $\alpha$  in Kardiomyozyten mittels Immunoblotting. Nach einer Immunpräzipitation in Überständen von Kardiomyozyten-Homogenaten mit dem anti-B56 $\alpha$ -Antikörper wurde die Expression von B56 $\alpha$  mittels Western Blotting bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression in Zellen nach 60-minütiger Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA, normiert auf den basalen Ausgangswert. (n, Anzahl der Kardiomyozytenpräparationen)

Im Anschluss an die Bestimmung der Proteinexpression wurde der Phosphorylierungsgrad von B56 $\alpha$  in immunpräzipitierten Überständen von Kardiomyozyten-Homogenaten von Wildtyp-Mäusen gemessen. Der Schritt einer Immunpräzipitation unter Benutzung eines anti-B56 $\alpha$ -Antikörpers war notwendig, um eine Anreicherung des Zielproteins für die Ermittlung des Phosphorylierungsgrades zu erreichen. Derzeit stehen keine spezifischen Antikörper, die gegen phosphorylierte Formen von B56 $\alpha$  der Maus gerichtet sind, zur Verfügung. Ein im Institut entwickelter Antikörper gegen phospho-Serin-41 erkennt leider nur die phosphorylierte Form des humanen Proteins (Kirchhefer et al., 2014a). Unter Benutzung der ProQ-Färbung konnte kein Unterschied für den Gesamt-Phosphorylierungszustand von B56 $\alpha$  zwischen den mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA behandelten Zellen und den nicht-behandelten

Zellen festgestellt werden (Abbildung 51). Der mittels Sypro Ruby gemessene Proteingehalt für B56 $\alpha$  war außerdem zwischen beiden Proben unverändert (Abbildung 51). Nach Bezug des Gesamt-Phosphorylierungsgrades auf den Proteingehalt ergibt sich eine unveränderte Ratio zwischen PE/PMA-stimulierten Kardiomyozyten und basalen Bedingungen (Abbildung 51). Dieses Ergebnis schließt allerdings nicht aus, dass der Phosphorylierungsgrad für einzelne bekannte oder putative Phosphorylierungsstellen von B56 $\alpha$  verändert sein kann.



Abbildung 51: Gesamt-Phosphorylierungsgrad von B56 $\alpha$  in Kardiomyozyten. Nach Immunpräzipitation unter Benutzung eines spezifischen Antikörpers zur Anreicherung von B56 $\alpha$  in Überständen von Kardiomyozyten-Homogenaten wurde die relative Intensität der Phosphorylierung von B56 $\alpha$  (pB56 $\alpha$ ) durch Anfärben mit ProQ-Diamond und Sypro Ruby-Lösung ermittelt. Die Ratio zwischen Phosphorylierungsgrad und Proteinexpression wurde unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-6</sup> M PMA bestimmt. (n, Anzahl der Kardiomyozytenpräparationen)

Zusätzlich wurden die Proteinexpression und die Phosphorylierung von B56 $\alpha$  an Vorhofpräparaten gemessen, um analog zu den vorhergehenden Versuchen auch den Effekt an multizellulären Organen bestimmen zu können. Im Vergleich zu den Kardiomyozyten ergibt sich auch für die Bestimmung der Proteinexpression von B56 $\alpha$  in Immunpräzipitaten aus homogenisierten linken Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen keine Änderung zwischen PKC-stimulierten und nicht-behandelten Proben (Abbildung 52 und 53). Die Messung des Expressionsgrades wurde wiederum sowohl mittels Coomassie-Färbung als auch Western Blotting durchgeführt.



Abbildung 52: Expression von B56 $\alpha$  in Immunpräzipitaten von linken Vorhof-Homogenaten unter basalen Bedingungen und nach kombinierter Stimulation mit PE und PMA mit Hilfe von Coomassie-Färbungen. Gezeigt ist der Expressionsgrad von B56 $\alpha$  in Immunpräzipitaten aus Homogenaten linker Atrien nach Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA im Vergleich zu nicht-behandelten Proben. (n, Anzahl der Proben)



Abbildung 53: Proteinexpression von B56 $\alpha$  in linken atrialen Homogenaten nach Immunpräzipitation unter basalen Bedingungen und nach PE- und PMA-Stimulation. Gezeigt ist die relative B56 $\alpha$ -Expression nach Behandlung mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA im Vergleich zu basalen Ausgangsbedingungen. Die Bestimmung des Expressionsgrades erfolgte mittels Immunoblotting durch Einsatz eines spezifischen anti-B56 $\alpha$ -Antikörpers. (n, Anzahl der Proben)

Neben der Proteinexpression wurde auch der Gesamt-Phosphorylierungszustand in den Vorhof-Immunpräzipitaten bestimmt. Im Vergleich zu den Messungen an den Kardiomyozyten-Präparationen ergibt sich auch hier keine Veränderung für das Verhältnis von phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem B56 $\alpha$  in PE/PMA-stimulierten und basalen Bedingungen (Abbildung 54).



Abbildung 54: Phosphorylierungszustand von B56 $\alpha$  unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 10<sup>-4</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA in Immunpräzipitaten linker Vorhof-Homogenate. Veranschaulicht ist die relative Intensität von phosphoryliertem B56 $\alpha$  (pB56 $\alpha$ ) in PKC-stimulierten Proben zum basalen Ausgangswert. Die Ratio wurde aus der kombinierten Färbung mittels ProQ-Diamond und anschließender Gabe von Sypro Ruby bestimmt, so dass sich ein Quotient aus Phosphorylierungsgrad zum Gesamtprotein ergibt. (n, Anzahl der Proben)
## **5** Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung einer PKC-abhängigen Phosphorylierungsstelle von B56 $\alpha$ , Serin-41 (Kirchhefer et al., 2014a). Dabei wird die durch nicht-phosphoryliertes B56 $\alpha$  beobachtete Hemmung der PP2A-Aktivität durch PKCphosphoryliertes B56 $\alpha$  noch weiter verstärkt. Ausdruck dessen ist die Verschiebung der PP2A-Hemmkonstante von 2 nM nach 0,5 nM. Diese Effekte könnten zusammen mit der in insuffizienten menschlichen Herzen aufgrund ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie beobachteten Erhöhung der B56 $\alpha$ -Phosphorylierung von Serin-41 (Kirchhefer et al., 2014a) auf eine grundlegende pathophysiologische Bedeutung der PP2A-Regulation durch den Phosphorylierungsgrad von regulatorischen B-Untereinheiten am Herzen hinweisen. Auch andere B-Untereinheiten werden durch Proteinkinasen phosphoryliert, wie zum Beispiel die B56 $\delta$ -Untereinheit, die im Herzen und in der Niere durch PKC und PKA an Serin-566 phosphoryliert wird (Ahn et al., 2007), oder die B56 $\alpha$ -Untereinheit, die durch PKR ebenfalls phosphoryliert wird (Xu und Williams, 2000). Außerdem phosphoryliert auch die PKA die B56 $\alpha$ -Untereinheit der PP2A (Kirchhefer et al., 2014a). Die Phosphorylierungsstelle konnte allerdings bis dato noch nicht identifiziert werden.

Unter der Vorstellung, dass die Ausprägung der myozellulären Effekte einer PKCvermittelten Phosphorylierung von B56α vom Expressionsgrad dieser regulatorischen Untereinheit der PP2A abhängig ist, wurde in der vorliegenden Studie ein transgenes Tiermodell verwendet. Diese transgene Mauslinie zeichnet sich durch eine herzspezifische Überexpression von B56α unter der Kontrolle des αMHC-Promoters aus (Kirchhefer et al., 2014b). Die basale Charakterisierung dieses Tiermodells zeigte bereits den Zusammenhang zwischen der herzspezifischen Überexpression von B56α und der Umverteilung der PP2A Expression bzw. Aktivität in Zellen (Kirchhefer et al., 2014b). Außerdem sollte eine Erhöhung der Kalziumsensitivität sowie eine Steigerung der Kontraktilität anhand dieses Tiermodells gezeigt werden. Auf Grund einer Verdopplung der B56α-Proteinexpression im Herzen sollten die Phosphorylierung bekannter und putativer Phosphorylierungsstellen erhöht und damit die Hemmung der PP2A-Aktivität gesteigert werden. Nach unseren Beobachtungen zeichneten sich jedoch in zellphysiologischen Versuchen teilweise konträre Effekte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ab. Diese könnten auf kompensatorische Mechanismen durch B56α-Überexpression (z.B. eine erhöhte basale Kontraktionskraft oder eine verminderte Phosphorylierung wichtiger kontraktiler Proteine) bedingt sein, was zum Ausschluss der transgenen Tiere aus der Versuchsreihe für die kontraktilen Messungen an Vorhofpräparaten und zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von  $B56\alpha$  führte.

In Anlehnung an die hypothetische Signaltransduktionskaskade (Abbildung 55) wurde der Versuchsaufbau dieser Arbeit gestaltet. Dazu wurde die PKC $\alpha$  pharmakologisch aktiviert, um über eine potentielle Abnahme der PP2A-Aktivität zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und somit einer Steigerung sowohl der maximalen Zellkontraktion als auch Relaxation der Kardiomyozyten zu kommen. Die einzelnen Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.



Abbildung 55: Schematische Darstellung zur hypothetischen Regulation der kardialen Kontraktionskraft über eine PKC-abhängige Phosphorylierung von B56 $\alpha$ . Phenylephrin (PE) aktiviert die G<sub>q</sub>-Proteingekoppelte Signalkaskade. Dadurch wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert und spaltet dann Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> aktiviert den Ryanodinrezeptor (RYR). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ins Zytosol. DAG hingegen aktiviert, ebenso wie das strukturähnliche Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), die Proteinkinase C, die dann den Serin-41 (S<sup>41</sup>)-Rest an der B56 $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert und damit die Proteinphosphatase 2A (PP2A) inhibiert. A $\alpha$  und C $\alpha$  sind die strukturelle bzw. die katalytische Untereinheit der PP2A und bilden das Core-Enzym. Zusammen mit B56 $\alpha$  ist dies ein vollständiges heterotrimeres PP2A-Molekül (modifiziert nach Kirchhefer et al., 2014a).

# 5.1 Pharmakologische Aktivierung der PKC durch Phenylephrin und PMA

Als ein erster Schritt der Arbeit stand die Frage nach den pharmakologischen Möglichkeiten einer Aktivierung der PKC, um eine maximale intrazelluläre Phosphorylierung von potentiellen Zielproteinen (z.B. B56a und andere B56-Untereinheiten) zu ermöglichen. Dazu existieren zwei Möglichkeiten, zum einen die direkte Aktivierung durch den Phorbolester Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), zum anderen die indirekte Aktivierung durch das Sympathomimetikum Phenylephrin (PE). Da PE als  $\alpha_1$ -Adrenozeptoragonist ebenfalls  $\beta$ adrenerge Effekte aufweisen kann (Torp et al., 2001), wurde zur Verifizierung einer vorwiegend α-adrenergen Reaktion durch PE ein Kontrollversuch unter additiver Gabe von Isoprenalin (ISO) an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierbei kam es im Vergleich zum Basalwert unter 10<sup>-5</sup> M PE zu einer 5,4-fachen Steigerung der myozellulären Kontraktion, die als SL-Verkürzung gemessen wurde. Die Peakamplitude der Kalzium-Transienten nahm unter zusätzlicher ISO-Applikation auch 3,5-fach zu. Vergleichbare Steigerungen von Zellkontraktilität und  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> wurden bei Messungen mit alleiniger Gabe von 10<sup>-6</sup> M ISO registriert (Kirchhefer et al., 2014b). Ferner war in meiner Arbeit der Abfall der Relaxationskinetik wie auch der intrazellulären Kalzium-Transienten prozentual vergleichbar zu alten Ergebnissen ohne PE-Vorstimulation (Kirchhefer et al., 2014b). Diese ISO-bedingten Effekte lassen auf eine nur minimale Restaktivierung von β-Adrenozeptoren durch PE schließen. Mit anderen Worten, die Gabe von 10<sup>-5</sup> M PE sollte demnach zu einer vorwiegenden Besetzung von α-Adrenozeptoren mit nachfolgender Aktivierung der PKC führen.

Die direkte Stimulation der PKC durch die Applikation von PMA (Ytrehus et al., 1994) stellt in der vorliegenden Arbeit ein wichtiges Hilfsmittel zur Beurteilung der biologischen Antwort PKC-aktivierter Signalwege dar. Bekannte PKC-vermittelte Signalwege sind z. B die Aktivierung der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3, Moore et al., 2013) oder auch die Aktivierung der mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase (MEK/ERK, Mackay und Twelves, 2007). Dennoch wurden die erhobenen Daten immer mit denen einer alleinigen Stimulation mit PE verglichen, da noch einige andere zelluläre Ziele, wie zum Beispiel das Phorbolester-bindende Protein, Munc-13, welches für die rasche Nachlieferung akut freisetzbarer Vesikel an Synapsen verantwortlich ist, für Phorbolester existieren (Buchner, 2000). Es wurden deshalb in einem Kontrollversuch die PKC-Aktivität (Yasuda et al., 1990) in Überständen von Wildtyp-Kardiomyozyten unter maximaler Stimulation von PE und PMA gemessen. Diese stieg nach kombinierter Gabe von beiden Wirkstoffen um mehr als das Doppelte im Vergleich zu nicht-behandelten Proben an. Es kommt somit tatsächlich zu einer PKC-Stimulation in den Kardiomyozyten, so dass die funktionellen Auswirkungen einer potentiellen PKC-abhängigen Phosphorylierung von B56α untersucht werden können.

Die zellulären Reaktionen auf PKC-vermittelte Effekte kann mittels der Messung der Einzelkontraktion und Kalzium-Transienten bestimmt werden (Dobson et al., 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der PKC zu einer Aktivierung der L-Typ Kalzium-Kanalströme führt (Woo und Lee, 1999) sowie zur Aktivierung des Natrium-Kalzium-Austauschers (NCX, Puglisi et al., 2011).

# 5.2 Charakterisierung der myozellulären Kontraktion und Kalzium-Homöostase an isolierten Kardiomyozyten und Vorhof-präparaten

Nach PE-Stimulation isolierter Wildtyp-Kardiomyozyten kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Peakamplitude und einer beschleunigten Abfallkinetik der Kalzium-Transienten, jedoch nicht zu einer verstärkten SL-Verkürzung und Relaxation. Dieser Effekt könnte seinen Ursprung in einer reduzierten myofilamentären Kalzium-Sensitivität nach Aktivierung durch die PKC haben (Kooij et al., 2009). Eine verminderte Kalzium-Sensitivität wurde auch in Maus-Kardiomyozyten nach Stimulation mit PE beobachtet (Hirano et al., 2006). Die Abnahme der Kalzium-Sensitivität entsteht durch eine gesteigerte PKC-induzierte Troponin T (TnT)- und Troponin I (TnI)-Phosphorylierung in Kardiomyozyten (Layland et al., 2005). TnT wird *in vitro* durch verschiedene PKC-Isoformen (z. B.  $\alpha$  und  $\delta$ ) an Threonin-Serin-194, Threonin-199 und Threonin-280 in unterschiedlichem Umfang 190. phosphoryliert. Durch die PKCα-induzierte TnT-Phosphorylierung kommt es somit zu einer verminderten Kalzium-Sensitivität (Jideama et al., 1996). TnI besitzt auch mehrere Phosphorylierungsstellen, wovon Serin-43/45 und Threonin-144 durch PKC phosphoryliert werden können (Noland et al., 1989). Serin-23/24 wird hauptsächlich durch PKA phosphoryliert, kann aber über Querphosphorylierung ebenfalls durch die PKC genutzt werden (Noland et al., 1989). Die Phosphorylierung des Serin-43/45-Aminosäurerests bewirkt eine Senkung der Kalzium-Sensitivität in Bezug auf die Kraftentwicklung im Herzen. Die

Phosphorylierung des Threonin-144-Rests hingegen führt zu einer Verminderung der Kalzium-Sensitivität in Bezug auf das Filamentgleiten des Querbrückenzykluses (Burkart et al., 2003). Falls die PKC nicht in der Lage ist, den Serin-43/45-Aminosäurerest zu phosphorylieren, weicht sie auf die PKA-Phosphorylierungsstelle Serin-23/24 aus und senkt damit ebenfalls die Kalzium-Sensitivität (Roman et al., 2004). Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von kardialem TnI reflektieren Veränderungen in der Balance zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Die Dephosphorylierung von TnI erfolgt vorwiegend durch die PP2A (Ke et al., 2004). Die Aktivierung der PP2A kann über unterschiedliche Signalwege stattfinden, zum einen über die p21-activated Kinase 1 (PAK1), zum anderen über die p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK; Liu und Hofmann, 2003). Durch die PP2A-abhängige Dephosphorylierung des Serin-23/24-Aminosäurerests von TnI kommt es zu einer steigenden Kalzium-Sensitivität, Reduktion der Querbrückenzyklusrate sowie diastolischen Dysfunktion (Ke et al., 2004; Liu und Hofmann, 2003). Entsprechend der eingangs aufgestellten Hypothese sollte die Aktivierung der PKC neben einer Phosphorylierung von TnI und TnT außerdem noch zu einer Hemmung der PP2A-Aktivität führen. Beide Prozesse würden somit zu einer überschießenden Phosphorylierung am Serin-23/24-Rest von TnI und zu einer reduzierten Kalzium-Sensitivität beitragen. Letzteres konnte durch unsere Messungen bestätigt werden. Die Bestimmung des PKC-vermittelten Phosphorylierungsgrades von TnI und anderen myofilamentären Proteinen ist das Ziel folgender Studien. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte an ventrikulären Meerschweinchen-Kardiomyozyten gezeigt werden, dass die Aktivierung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch Gabe von PE zu einem Anstieg der Kalzium-Transienten führt (Woo und Lee, 1999). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten die Autoren eine gesteigerte zelluläre Kontraktilität messen. Dieser Unterschied zwischen beiden Studien könnte sowohl spezies- als auch messbedingte Ursachen haben. Ferner ergaben unsere Untersuchungen, dass PE alleine keine lusitropen Wirkungen aufweist. Vergleichbare Daten wurden in einer älteren Studie bereits erhoben (Aoyagi et al., 1991).

Nach einer Stimulation von Kardiomyozyten transgener B56α-überexprimierender Mäuse mit PE geht die Zunahme der Peakamplitude und die gesteigerte Abfallkinetik der Kalzium-Transienten im Gegensatz zu den Wildtypzellen mit parallelen Veränderungen der gemessenen kontraktilen Parameter einher. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in der erhöhten basalen Kalzium-Sensitivität der transgenen Kardiomyozyten liegen (Kirchhefer et al., 2014b). Die PE-bedingte Aktivierung der PKC wäre somit nicht in der Lage, die beobachteten Effekte einer gesteigerten PP2A-Aktivität und den verminderten Phosphorylierungszustand kontraktiler Proteine (z.B. TnI und TnT) in den transgenen Kardiomyozyten zu kompensieren.

Neben der Testung der funktionellen Effekte einer alleinigen Stimulation mit PE an isolierten Herzmuskelzellen wurden auch linke Vorhöfe von Wildtyp-Mäusen untersucht. Ausgangspunkt dieser Messungen war die Frage, ob die an einzelnen Kardiomyozyten beobachteten physiologischen Ergebnisse auf multizelluläre Präparate übertragbar sind. Die Gabe von PE in das Organbad führte im Gegensatz zu den Einzelzellen zu einer Steigerung der Kontraktionskraft im Vergleich zu unbehandelten Präparaten. Unsere Daten werden von Untersuchungen an linken Atrien von Ratten unter Stimulation mit PE bestätigt (Nakashima et al., 1971). Eine stärkere  $\alpha_1$ -adrenerge Reaktion im Vorhof im Vergleich zum Ventrikel ist trotz geringerer  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Dichte von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben worden (Steinfath et al., 1992). Der Unterschied in der Kontraktionskraftentwicklung zwischen ventrikulären Kardiomyozyten und atrialen Präparaten kann auf zusätzlich noch vorhandene Strukturen im multizellulären Präparat, wie z. B. Kollagenfasern oder auch Blutgefäße, zurückzuführen sein. Außerdem wurde zur Bestimmung der Kontraktionskraft an den Vorhöfen durch uns eine andere Methode als bei den Zellen angewendet, bei der eine bestimmte Vorspannung an die Muskulatur angelegt wird (=isotonische Kontraktion). Es ist vorstellbar, dass es sich beim Kontraktionsanstieg im Vorhof zum Teil um eine Myosinleichtketten (MLCK)-vermittelte Reaktion handelt, die durch Phosphorylierung nach PE-Gabe verstärkt wird (Grimm et al., 2005). Es kann ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Expression bzw. Verteilung regulatorischer Untereinheiten der PP2A für die Unterschiede zwischen ventrikulärer und atrialer Kontraktion verantwortlich ist (Degrande et al., 2013). Jedoch konnte ein geringerer mRNA-Gehalt für die katalytische Untereinheit der PP2A in humanen Atrien im Vergleich zum Ventrikel gemessen werden (Lüss et al., 2000). Ferner ist in Vorhöfen im Unterschied zu ventrikulärem Gewebe die Proteinexpression von SERCA2a erhöht und die von Phospholamban erniedrigt (Lüss et al., 1999). Schließlich besteht ein bedeutender Unterschied in der Kalzium-Homöostase zwischen Vorhof und Ventrikel. Auf Grund der fehlenden T-Tubuli im Atrium bedarf es einer sehr viel stärkeren Aktivierung, um einen Kalziumanstieg im Zentrum der atrialen Zellen sowie des gesamten Atriums zu bewirken. Daher kommt es unter Ruhebedingungen zu einer geringeren atrialen Kontraktion im Vergleich zum Ventrikel. Erst bei einer starken Aktivierung triggern die peripheren Zellen eine zentripetale Kalziumwelle ins Innere des Atriums, und es kommt zur gesteigerten Kontraktion. Im Ventrikel herrscht dagegen eine ausgeprägte Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung vor (Bootman et al., 2011). Diese Prozesse könnten somit teilweise oder vollständig zu den beobachteten Unterschieden zwischen PE-stimulierten isolierten Kardiomyozyten und Vorhöfen beitragen.

Durch die Gabe von PMA sollte eine direktere und stärkere Aktivierung der PKC erreicht werden. PMA ist ein potenter PKC-Aktivator (Castagnag et al., 1982), der konzentrationsabhängig wirkt (Ward und Moffat, 1992). Im Gegensatz zur ausschließlichen Gabe von PE stieg die maximale myozelluläre Kontraktion unter der Gabe von PMA in den Wildtyp-Kardiomyozyten an. Dieser neu aufgetretene Effekt erfolgte unter einer vergleichbaren Zunahme der intrazellulären Peakamplitude der Kalzium-Transienten. Aus diesen Daten kann vermutet werden, dass die PE-Stimulation des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors noch andere zelluläre Effekte außer einer Aktivierung der PKC aufweist. Nach Aktivierung des G<sub>a</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptors kommt es zur Aktivierung der PLC, welche PIP<sub>2</sub> in DAG  $(\rightarrow \text{Aktivierung der PKC})$  und IP<sub>3</sub> spaltet. Dieses IP<sub>3</sub> aktiviert sowohl IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) als auch Ryanodinrezeptoren (RyR). Die IP<sub>3</sub>R spielen in der frühen Herzentwicklung eine große Rolle, später sinkt deren Expression. Bei den RyR hingegen verhält es sich genau gegenläufig. Die Anzahl der Rezeptoren steigt im Alter (Niggli, 2015). Beide Rezeptoren bewirken einen Kalzium-getriggerten Kalzium-Einstrom in die Zelle aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die IP3-vermittelte Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium könnte somit an der Abnahme der myofilamentären Kalzium-Sensitivität in den Wildtyp-Zellen beteiligt sein und teilweise den ausbleibenden Effekt einer SL-Verkürzung erklären. Die kombinierte Stimulation mit PE und PMA nach Vorstimulation mit PMA ergibt eine weitere Zunahme von SL-Verkürzung und  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub>. Aus dem Vergleich der Ergebnisse kann geschlossen werden, dass unter der Voraussetzung einer maximalen Aktivierung der PKC durch die eingesetzte PMA-Konzentration (Liou et al., 2000) ungefähr ein Drittel des durch PE bedingten Anstiegs der Peakamplitude der Kalzium-Transienten nicht durch eine Stimulation der PKC bedingt ist. Passend zu diesen Daten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Verkürzung des Abfalls der Kalzium-Transienten und Beschleunigung der zellulären Relaxationskinetik unter kombinierter Gabe von PMA und PE gemessen werden. Dieser Effekt war jeweils unter Einzelgabe der Substanzen nicht zu beobachten. Wie bereits oben diskutiert, kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass sich ein Teil der PE-bedingten funktionellen Effekte auf PKC-unabhängige intrazelluläre Wirkungen zurückführen lässt. Über diese und weitere Wirkungen (z. B. unspezifische

Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren) kann auch die Zunahme der Kontraktionskraft an linken Atrien von Wildtyp-Mäusen unter höherer PE-Konzentration (10<sup>-4</sup> M) im Vergleich zur üblicherweise eingesetzten Konzentration von 10<sup>-5</sup> M in Kombination mit PMA erklärt werden. Die transgenen Herzmuskelzellen weisen im Vergleich zur alleinigen Gabe von PE parallele Veränderungen der Peakamplitude der Kalzium-Transienten und SL-Verkürzung bei Stimulation mit PMA und PE auf. Aus den geringeren prozentualen Zunahmen dieser Parameter nach alleiniger Gabe von PMA lässt sich wiederum eine additive, PKCunabhängige Aktivierung von Kalzium-mobilisierenden Signalwegen schlussfolgern (s.o.).

## 5.3 Beeinflussung der PP2A-Aktivität durch direkte und indirekte Aktivierung der PKC

Frühere Ergebnisse in HEK293-Zellen zeigten bereits, dass deren Stimulation mittels 10<sup>-5</sup> M PE und 10<sup>-7</sup> M PMA zu einem Abfall der PP2A-Aktivität führt (Kirchhefer et al., 2014a). Dieser Effekt war mit einer vermehrten Kalzium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum dieser Zellen verbunden. Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, ob die gemessenen funktionellen Effekte der myozellulären Kontraktilität und Kalzium-Homöostase mit Veränderungen der PP2A-Aktivität einhergehen. Dazu wurden isolierte Kardiomyozyten oder linke Vorhöfe mit PE, PMA oder in Kombination beider Substanzen zur Aktivierung der PKC in den für die physiologischen Messungen benutzten Konzentrationen vorstimuliert. Zur Bestimmung der PP-Aktivitäten wurden Zell- oder Vorhofüberstände und <sup>32</sup>P-markierte Phosphorylase a als Substrat eingesetzt. Die Differenzierung zwischen PP1 und PP2A erfolgte mittels Inkubation von 3 nM Okadasäure (Abbildung 17). Diese Konzentration wurde auf der Grundlage früherer Messungen an Homogenaten aus ventrikulärem Herzgewebe verwendet (Neumann et al., 1993; Bokník et al., 2000; Kirchhefer et al., 2014b). Während die alleinige Gabe von PE keine Auswirkungen auf die Geamtaktivität, PP1- und PP2A-Aktivität in isolierten Zellen und Vorhofpräparaten von Wildtyp-Mäusen hatte, führte die Stimulation mit PMA zu einer exklusiven Abnahme der PP2A-Aktivität in den Herzmuskelzellen. Die gemeinsame Gabe von PE und PMA führte auch zu einer ausschließlichen Verminderung der PP2A-Aktivität. Eine kausale Wirkung von PMA auf die PP2A kann vermutet werden, da die PP1-Aktivität unter beiden Bedingungen unverändert blieb. Es existieren zahlreiche Beispiele in der Literatur für eine unabhängige Regulation beider Proteinphosphatasen (Braz et al., 2004). Die

Spezifität der Wirkungen von PMA auf die PP2A über eine akute Aktivierung der PKC kann auch aus den Daten an transgenen Kardiomyozyten abgeleitet werden. Hier nahm die PP2A-Aktivität unter Stimulation mit PE ab, während die Gabe von PMA in An- oder Abwesenheit von PE keine Veränderung nach sich zog. Der Effekt einer direkten Aktivierung der PKC durch PMA scheint somit die PE-vermittelten Wirkungen zu übertreffen. Die chronische herzspezifische Aktivierung der PKC $\alpha$  in einem transgenen Mausmodell scheint eher gegenteilige Effekte aufzuweisen. Hier kommt es zu einer Aktivitätserhöhung der PP1, während die PP2A-Aktivität unverändert bleibt (Braz et al., 2004). Dies könnte bedeuten, dass es zu einer Desensitivierung der Phosphorylierungsstellen der PP2A-Untereinheiten mit der Zeit kommt. Die Folgen wären eine Aufhebung der unter akuter PKC-Stimulation beobachteten PP2A-Hemmung und eine Inaktivierung der PKC.

# 5.4 Phosphorylierungsstatus von B56α in isolierten Kardiomyozyten und Vorhofpräparaten

Auf der Suche nach den Ursachen der erniedrigten PP2A-Aktivität nach einer Aktivierung der PKC durch Gabe von PMA (± PE) wurde entsprechend der eingangs der Arbeit aufgestellten Hypothese der Phosphorylierungszustand von B56a untersucht. Ausgangspunkt dieser Überlegung waren Ergebnisse der Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass die Reduktion der PP2A-Aktivität in transfizierten HEK293-Zellen nach Stimulation mit PMA und PE durch die Phosphorylierung der B56α-Untereinheit an Serin-41 entsteht (Kirchhefer et al., 2014a). Ursprünglich konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der PP2A durch die PKC auf einer ihrer regulatorischen Untereinheiten stattfindet (Ricciarelli und Azzi, 1998). Diese Autoren detektierten ein PKC-phosphoryliertes Protein von 55 kDa, waren aber nicht in der Lage, die Isoform der B-Untereinheit der PP2A zu identifizieren. Inzwischen konnten mehrere Phosphorylierungsstellen an einzelnen B56-Untereinheiten, die alle als Phosphoproteine fungieren, nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der B56- und anderer B-Untereinheiten kann entweder den Zusammenbau des PP2A-Heterotrimers oder aber die enzymatische Aktivität und Lokalisation in der Zelle beeinflussen. So bewirkt die Phosphorylierung der B56y1-Untereinheit am Serin-327-Rest durch die ERK (extracellular signal-regulated kinase) ebenfalls eine Hemmung der PP2A-Aktivität (Letourneux et al., 2006). Eine vergleichbare Wirkung konnte durch Phosphorylierung der B56y3-Untereinheit

am Serin-510-Rest durch ATM (ataxia-telangiectasia mutated) erreicht werden (Shouse et al., 2011). Die Phosphorylierung der B56y3-Untereinheit durch die "Checkpoint-Kinase" Ch2 hingegen zieht eine Steigerung der PP2A-Aktivität nach sich (Dozier et al., 2004). Eine Steigerung der PP2A-Aktivität konnte außerdem bei einer Phosphorylierung am Serin-566-Aminosäurerest der B568-Untereinheit mit Hilfe der PKA und der PKC in neuronalen Zellen beobachtet werden (Ahn et al., 2007, 2011). Diese Versuche machen deutlich, dass die Phosphorylierung einer speziellen Untereinheit mit unterschiedlichen Enzymen oder in unterschiedlichen Zelltypen zu einer entgegengesetzten Entwicklung der PP2A-Aktivität führen kann. Diese Beobachtung wird auch dadurch verdeutlicht, dass es bei einer Phosphorylierung von B56a mit CaM-Kinase II zu einer Aktivitätssteigerung der PP2A kommt (Kirchhefer et al., 2014a). Dieser Effekt einer zellspezifischen Phosphorylierung von B56a und anderen B-Untereinheiten könnte eine Erklärung dafür sein, warum in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung des B56a-Phosphorylierungsgrades sowohl in isolierten Kardiomyozyten als auch an multizellulären Vorhofpräparaten gemessen wurde. Da die PKC-vermittelte Phosphorylierung von B568 in neuronalen Zellen (Ahn et al., 2011) zu einer Aktivierung der PP2A führt, wäre in zukünftigen Studien zu untersuchen, ob dieser Effekt ebenfalls in Kardiomyozyten auftritt. Falls nicht, wäre dieses ein weiterer Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung einzelner B56-Untereinheiten durch ein und dasselbe Enzym zellspezifisch abläuft. Eine unveränderte Gesamtphosphorylierung von B56a schließt trotzdem eine vermehrte Phosphorylierung an Serin-41 nicht aus, da weitere, bisher nicht identifizierte PKC-Phosphorylierungsstellen existieren können. Neben der Annahme, dass die Phosphorylierung der B56a-Untereinheit zellspezifisch ist (d.h. nicht in Herzmuskelzellen auftritt), besteht auch die Möglichkeit, dass die PKC zwar grundsätzlich in der Lage ist, diese Untereinheit zu phosphorylieren, aber zu einer der anderen B-Untereinheiten eine höhere Affinität aufweist. Die PKC-abhängige Phosphorylierung einer anderen B-Untereinheit könnte dann wiederum auch eine Aktivitätsminderung der PP2A in Kardiomyozyten nach sich ziehen. Alle weiteren B56-Untereinheiten werden sowohl im Ventrikel als auch im Vorhof exprimiert und tragen potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC (DeGrande et al., 2013). Der Nachweis der PKC-vermittelten Phosphorylierung einer dieser Untereinheiten könnte Gegenstand weiterer Forschung sein. Prinzipiell ist es jedoch auch außerhalb dieser molekular-mechanistischen Überlegungen möglich, dass die verwendete Nachweismethode der Phosphorylierung mit der ProQ-Diamond-Färbung (Martin et al., 2003; Steinberg et al.,

2003) nicht sensitiv genug war. Die Methode eines Nachweises von phosphoryliertem B56 $\alpha$ an B56 $\alpha$ -immunpräzipitierten myozellulären Proben mittels ProQ-Diamond wurde eingesetzt, da die in Vorversuchen getesteten anti-Phosphoserin/Phosphothreonin-Antikörper kein spezifisches Signal bei PKC-phosphorylierten Wildtyp-Kardiomyozyten oder PKAphosphoryliertem rekombinantem Phospholamban zeigten.

## 6 Zusammenfassung

## Beeinflussung der Kontraktionskraft des Herzens über eine Proteinkinase C-abhängige Regulation der Proteinphosphatase 2A

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob sich durch eine pharmakologische Aktivierung der PKC die Kontraktilität und das Kalzium-Handling von Kardiomyozyten durch eine Veränderung der B56α-regulierten PP2A-Aktivität beeinflussen lassen. Dazu wurde die PKC durch Applikation von Phenylephrin (PE) und Phorbol-12myristat-13-acetat (PMA) an Kardiomyozyten und linken Vorhöfen von B56aüberexprimierenden und Wildtyp-Mäusen aktiviert. Die optimale PE-Konzentration wurde mittels Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Zur Differenzierung der Effekte von PE auf αund β-Adrenozeptoren wurde zusätzlich Isoprenalin appliziert. Die durch pharmakologische Aktivierung der PKC mittels PE und PMA ausgelösten funktionellen Effekte wurden durch Messung der myozellulären Sarkomerlängen (SL) und Kalzium-Transienten sowie der Kontraktionskraft an linksatrialen Präparaten bestimmt. Die Gabe von PE führte in Wildtyp-Zellen, die die intrazelluläre Situation unter nativen physiologischen Bedingungen widerspiegeln, zu einem Anstieg der Peakamplitude und einer Verkürzung der Abfallzeit der Kalzium-Transienten. Die SL-Verkürzung änderte sich ebenso wie die Relaxationszeit dagegen nicht. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine Abnahme der myofilamentären Kalzium-Sensitivität erklären. Die direkte Aktivierung der PKC durch Gabe von PMA bewirkte in An- oder Abwesenheit von PE einen Anstieg der SL-Verkürzung und von  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> in Wildtyp-Kardiomyozyten. Darüber hinaus war die Relaxationszeit und die Abfallzeit der Kalzium-Transienten verkürzt. Vergleichbare kontraktile Effekte einer Stimulation mit PMA und PE wurden in linken Vorhofpräparaten registriert. Die in transgenen Kardiomyozyten beobachteten parallelen Veränderungen von gesteigerter

zellulärer Kontraktilität und Peakamplitude der Kalzium-Transienten nach pharmakologischer Stimulation der PKC könnten im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen ihre Ursache in der erhöhten basalen Kalzium-Sensitivität der Myofilamente haben. Die Zunahme der Kontraktilität und intrazellulären Peakamplitude der Kalzium-Transienten nach maximaler Aktivierung der PKC durch Gabe von PMA ( $\pm$  PE) war mit einer Abnahme der PP2A-Aktivität in Extrakten von isolierten Zellen oder atrialen Präparaten assoziiert. Dieser Effekt war unabhängig von entsprechenden Veränderungen der PP1-Aktivität. Im Gegensatz dazu waren PP2A- und PP1-Aktivität in transgenen Proben nach PMA-Gabe ( $\pm$  PE) unverändert. Die Abnahme der PP2A-Aktivität in Wildtyp-Herzen war allerdings nicht mit einer Veränderung des Gesamtphosphorylierungsgrades der regulatorischen Untereinheit B56 $\alpha$ vergesellschaftet. Dieses könnte sowohl auf die Phosphorylierung einer anderen regulatorischen B56-Untereinheit als auch auf eine zellspezifische PKC-abhängige (d.h. nicht in Kardiomyozyten) Phosphorylierung von B56 $\alpha$  hinweisen.

Zusammengefasst wird deutlich, dass entsprechend der Arbeitshypothese der Beweis eines Zusammenhangs von PKC-Aktivierung, positiver Inotropie in Herzmuskelpräparaten und Abnahme der PP2A-Aktivität erbracht werden konnte. Die Verminderung der PP2A-Aktivität ist jedoch nicht Folge einer vermehrten Phosphorylierung von B56α unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit.

## 7 Summary

# Cardiac contractility is influenced by protein kinase C-dependent regulation of protein phosphatase 2A

The main objective of the present study was the examination of the influence of PKC activation on cardiac contractility and  $Ca^{2+}$  handling by modulating the B56 $\alpha$ -regulated PP2A activity. For this purpose PKC was activated by the  $\alpha$ -adrenoceptor agonist phenylephrine (PE) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in ventricular cardiomyocytes and left atria of B56 $\alpha$ -overexpressing and wild-type mice. The functional effects of pharmacological PKC activation by PE and PMA were determined by measuring myocellular sarcomere lengths (SL) and Ca<sup>2+</sup> transients as well as force of contraction on left atrial preparations. The application of PE to wild-type cells, reflecting native physiological conditions, resulted in an

increase of the peak amplitude and a reduction of the decay time of  $Ca^{2+}$  transients. SL shortening and relaxation time were unchanged compared to controls. These findings might be explained by a decrease of the myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity. The direct activation of PKC by PMA caused an increase in SL shortening and  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> in wild-type cardiomyocytes, both in the presence or absence of PE. Furthermore, relaxation time and Ca<sup>2+</sup> transient kinetics were shortened. We observed comparable contractile effects after stimulation with PMA and PE in left atria. In contrast to wild-type cells, transgenic cardiomyocytes exhibited parallel increases of myocellular contractility and peak amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients after PKC stimulation. These effects may result from a higher basal myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in transgenic cardiomyocytes. The increase in SL shortening and  $\Delta$ [Ca]<sub>i</sub> in wild-type cardiomyocytes, following maximum PKC activation by PMA ( $\pm$  PE), was associated with a decrease in PP2A activity in extracts of isolated cells or atrial preparations, whereas PP1 activity was not changed. In transgenic samples, PP2A and PP1 activities remained unchanged after PMA application (± PE). However, the reduction in PP2A activity in wild-type hearts was not accompanied by changes in the total phosphorylation status of the regulatory subunit  $B56\alpha$ . This might result from either a phosphorylation of a different regulatory B56 subunit or other B56 $\alpha$ -independent mechanisms.

Taken together, according to the underlying working hypothesis this study provides evidence for a relationship between PKC activation, decreased PP2A activity and positive inotropy in myocardial preparations. However, the reduced PP2A activity is not a direct consequence of an increased B56 $\alpha$  phosphorylation under experimental conditions of the present study.

# 8 Anhang

## 8.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: NID-Puffer.

Substanz	Menge
KCL (1M)	12,5 ml
Tris/Cl pH 8,3 (1M)	2,5 ml
Igepal CA-630	1,13 ml
Gelatine (100mg/ml)	0,25 ml
ddH <sub>2</sub> O	Ad 250 ml

Die Lösungen wurden miteinander vermengt, mit destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf 250 ml aufgefüllt und autoklaviert.

#### Tabelle 3: PCR-Programm.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Vorgang
	95	3:00	Denaturierung
ſ	95	0:45	Denaturierung
30x {	57,5	0:45	Annealing
C	72	0:45	Verlängerung
	72	10:00	Verlängerung
	4	$\infty$	Abkühlung

#### Tabelle 4: 1% iges Agarose-Gel.

Substanz	Menge
Agarose (Serva)	2g
1x TAE-Puffer	200 ml
Ethidiumbromid (Sigma Aldrich)	8-10 µl

Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle 100 ml des 1x TAE-Puffers gelöst. Nach Zugabe des restlichen TAE-Puffers und kurzem Abkühlen wurde das Ethidiumbromid zugegeben und anschließend das Gel in den Träger gegossen.

#### Tabelle 5: 50x TAE-Puffer.

Substanz	Menge
Tris	242,1 g
EDTA	14,4 g
Eisessig	57,1 ml
ddH <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

Die Salze wurden in Eisessig gelöst und mit  $ddH_20$  auf 1L aufgefüllt. 1x TAE-Puffer:

100 ml 50x TAE-Puffer wurden mit 5 L ddH<sub>2</sub>O auf 1x TAE-Puffer verdünnt.

#### Tabelle 6: Chemikalien zur Herstellung des Perfunsionspuffers.

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht	Hersteller	Reinheit
Natriumchlorid	NaCl	58,5 g/mol	J.T. Baker	Min
				99,5%
Kaliumchlorid	KC1	74,6 g/mol	Merck	Min
				99,5%
Kaliumhydrogenphosp	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 g/mol	Merck	99,5-
hat				100,5%
Di-	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	177,99 g/mol	Merck	99,5%
Natriumhydrogenphos				
phat				
Magnesiumsulfat-	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	246,5 g/mol	Merck	Min
Heptahydrat				99,5%
Natrium-Bicarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	84,0 g/mol	SIGMA	99,7-
				100,3%
Kalium-Bikarbonat	KHCO <sub>3</sub>	101,0 g/mol	SIGMA-	Min
			Aldrich	99,5%
Taurin	$C_2H_7NO_3S$	125,1 g/mol	SIGMA	99%
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,31 g/mol	Carl Roth	99,5%
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	198,17 g/mol	Merck	
2,3.Butanedione	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101,10 g/mol	SIGMA	< 98%
monoxime				
Newborn Calf Serum			Gibco by life	
(NCS) 1 Stunde bei			technologies	
56°C hitzedeaktiviert				

Reagenz für Perfusionspuffer	Mol-Gewicht oder	Menge	End-
Stammlösung	Stammlösung-		konzentration
	Konzentration		
Natriumchlorid (NaCl)	58,5 g/mol	6,6 g	113 mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,6 g/mol	0,35 g	4,7 mM
Kaliumhydrogenphosphat	136,1 g/mol	0,082 g	0,6 mM
$(KH_2PO_4)$			
Di-Natriumhydrogenphosphat	177,99 g/mol	0,107 g	0,6 mM
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	246,5 g/mol	0,3 g	1,2 mM
$(MgSO_4 + 7H_2O)$			
Natrium-Bicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	84,0 g/mol	1,01 g	12 mM
Kalium-Bikarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	101,0 g/mol	1,01 g	10 mM
Taurin	125,1 g/mol	3,75 g	30 mM
HEPES-Lösung	1M	10 ml	10 mM
2,3-Butanedione Monoxime	101,10 g/mol	25,275 g/500 ml	5 ml/250 ml
		ddH2O	

Tabelle 7: Herstellung der Perfusionspuffer-Stammlösung.

Stammlösung für 1 Liter Perfusionspuffer (auf 1 Liter ddH<sub>2</sub>O auffüllen).

#### Tabelle 8: Perfusionspuffer.

Substanz	Menge
Perfusionspuffer-Stammlösung	250 ml
BDM-Lösung	5 ml
Glucose	500 mg

mit NaOH auf pH 7,46 titrieren.

#### Tabelle 9: Enzymlösung.

Substanz	Menge
Perfusionspuffer	25 ml
CaCl <sub>2</sub> 10 mM	12,5 μl
Trypsin 2,5%	75 μl
Liberase Dehydrase	333 µl

#### Tabelle 10: Stopplösung 1.

Substanz	Menge
Perfusionspuffer	9 ml
CaCl <sub>2</sub> 10 mM	12,5 μl
Newborn Calf Serum (NCS)	1 ml

Lagerung im Wasserbad bei 38°C.

#### Tabelle 11: Stopplösung 2.

Substanz	Menge
Perfusionspuffer	28,5 ml
CaCl <sub>2</sub> 10 mM	37,5 μl
NCS	1,5 ml

Lagerung im Wasserbad bei 38°C.

Substanz	Summenformel	Molekulargewicht	Hersteller	Reinheit
Pluronic® F-127	(low UV		Molecular	
	absorbance)		probes	
Dimethyl Sulfoxide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO	78,13 g/mol	SIGMA	Min 99,5%
(DMSO)				
Indo-1/AM	(cell permanent)		Life	
			technologies	
Phenylephrin-	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> +HCL	203,7 g/mol	SIGMA	
Hydrochlorid				
Immersol™ 518 F			Zeiss	
Isoprenalin-	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	247,72	SIGMA	
Hydrochloride				
РМА	$C_{36}H_{56}O_8$	616,8	Invivo Gen	
Natriumchlorid	NaCl	58,5 g/mol	J.T. Baker	Min 99,5%
Kaliumchlorid	KCl	74,6 g/mol	Merck	Min 99,5%
Kaliumhydrogen-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 g/mol	Merck	99,5-
phosphat				100,5%
Di-Natriumhydrogen-	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	177,99 g/mol	Merck	99,5%
phosphat				
Magnesiumsulfat-	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	246,5 g/mol	Merck	Min 99,5%
Heptahydrat				
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,31 g/mol	Carl Roth	99,5%
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	198,17 g/mol	Merck	

#### Tabelle 12: Chemikalien zur Kalziumstransientenbestimmung.

#### Tabelle 13: Lagerlösung.

Reagenz für Lagerlösung	Molgewicht	Menge	End-
			konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	58,4 g/mol	1,53 g/500 ml	52,5 mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,6 g/mol	0,179 g/500 ml	4,8 mM
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136,1 g/mol	0,082 g/500 ml	1,2 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	246,5 g/mol	0,148 g/500 ml	1,2 mM
$(MgSO_4 \times 7H_2O)$			
Glucose	198,17 g/mol	1,09 g/500 ml	11,1 mM
Saccharose		24,8 g/500 ml	145 M
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x 2	147,02 g/mol	0,0147 g/500	0,2 mM
H <sub>2</sub> O)		ml	
HEPES	238,31 g/mol	1,192 g/500 ml	10 mM

pH auf 7,3 einstellen.

#### Tabelle 14: 5x Kalzium freie Tyrode.

Reagenz für 5x Kalzium freie	Molgewicht	Menge	End-
Tyrode			konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	58,4 g/mol	20,45 g	140 mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,6 g/mol	1,08 g	5,8 mM
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136,1 g/mol	0,17 g	0,5 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	142,0 g/mol	0,18 g	0,4 mM
$(Na_2HPO_4 \times 2H_2O)$			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	246,5 g/mol	0,909 g	0,9 mM
$(MgSO_4 x 7H_2O)$			
HEPES		5,95 g	10 mM
Glucose			11,1 mM

auf 0,5 Liter  $ddH_2O$  auffüllen.

#### Anhang

#### Tabelle 15: Tyrode.

Substanz	Menge
5x Kalzium-freie Tyrode	100 ml
$CaCl_2(1M)$	1 ml
Glucose	1 g
ddH <sub>2</sub> O	Ad 500 ml

mit NaOH auf pH 7,3 titrieren.

#### Tabelle 16: Indolösung.

Substanz	Menge
Lagerlösung	250 µl
Indo-1 Acetoxymethylester (AM)	12,5 μl
Pluronic	10 µl

#### Tabelle 17: Stammreagenzien zur Kontraktionskraftmessung.

Stamm I
---------

Reagenz	Mol-Gewicht oder	Menge	End-
	Stammlösung-		konzentration
	Konzentration		
Natriumchlorid (NaCl)	58,5 g/mol	175 g	2,99 M
Kaliumchlorid (KCl)	74,6 g/mol	10 g	0,134 M
CaCl <sub>2</sub> -Stamm (CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	147,02 g/mol	20 ml	2,25 M
	165,57g/500 ml		
	ddH2O		
MgCl <sub>2</sub> -Stamm (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	203,31 g/mol	25 ml	105 M
	106,83g/500ml		
	ddH2O		
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml	

#### Stamm II

Reagenz	Mol-Gewicht oder	Menge	End-
	Stammlösung-		konzentration
	Konzentration		
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	84,01 g/mol	50 g	0,595 M
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml	

Stamm III

Reagenz	Mol-Gewicht oder	Menge	End-
	Stammlösung-		konzentration
	Konzentration		
Natriumdihydrogenphosphat	137,99 g/mol	5,8 g	0,042 M
(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )			
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml	

Ansatz Tyrode:		
40 ml Stamm I	Reagenz	Endkonzentration
38 ml Stamm II	Natriumchlorid (NaCl)	119,8 mM
10 ml Stamm III 1 g Glucose	Kaliumchlorid (KCl)	5,4 mM
50 mg Ascorbinsäure	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
18,6 mg Triplex III	MgCl <sub>2</sub>	1,05 mM
ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	22,6 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,05 mM
	Ascorbinsäure	0,28 mM
	Glucose	5,0 mM

Die Tyrode wurde mit 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$  begast. Der pH-Wert wurde bei 35°C im Wasserbad auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 18: Chemikalien für die Biochemie.

Chemikalie	Summenformel	Molekulargewicht	Hersteller	Reinheit
Acetonitrile	CH <sub>3</sub> CN	41,05 g/mol	J.T. Baker	
Acrylamid				
Ammonium-	$H_8N_2O_8S_2$	228,20 g/mol	SIGMA	>98%
Persulfate				
Bromphenol-blue	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	669,96 g/mol	Merck	
(ACS)				
Coomassie Brillant	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	854,03 g/mol	Merck	
Blau G250				
Di-	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> 0	177,99 g/mol	Roth	>98%
Natriumhydrogenphos				
phat-Dihydrat				
Eisessig	$C_2H_4O_2$	60,05 g/mol	Roth	96%
				100%
Glycerol ultrapur		92,02 g/mol	MP	
Glycine	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO	75,07 g/mol	Applichem	
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub> +6H <sub>2</sub> 0	203,30 g/mol	Merck	99-101%
Hexahydrat				
Methanol	CH <sub>4</sub> O	32,04 g/mol	Applichem	99%
Natriumacetat	CH <sub>3</sub> COONa	82,03 g/mol	Merck	99%
Natrium Chlorid	NaCl	58,44 g/mol	Applichem	99-
				100,5%
Natriumhydrogenphos	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	137,99 g/mol	Roth	>98%
phat Monohydrat				
NNNN	$C_6H_{16}N_2$	116,20 g/mol	SIGMA	99%
Tetramethylethylened				
iamine				
Polyacrylamid	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71,08 g/mol	Roth	
SDS ultrapur	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	288,38 g/mol	Roth	>99,5%
Triethanolamine	$N(CH_2CH_2OH)_3$	149,10 g/mol	Merck	
Tris ultrpur	$C_4H_{11}NO_3$	121,14 g/mol	Applichem	
Tritriplex EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N2Na <sub>2</sub> O8+	372,24 g/mol	Merck	
	H <sub>2</sub> O			
TWEEN 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	1.227,72 g/mol	Merck	

#### Tabelle 19: Inkubationslösung.

Substanz	Menge
Tris	62,5 mM
Magnesiumchlorid	20 mM
Calciumchlorid	1 mM
β-Mercaptoethanol	2,25%
BSA	0,25 g/l
Phosphorylase b	5 g/l
ATP	1 mM
γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	20 MBq/ml
Phosphorylase-Kinase	16,67 IU/ml
ddH <sub>2</sub> O	

pH auf 7,4 einstellen.

#### Tabelle 20: Dialysepuffer.

Substanz	Menge
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
ddH <sub>2</sub> O	

pH auf 7,4 einstellen.

#### Tabelle 21: Phosphorylase a enthaltende Lösung.

Substanz	Menge
Tris-HCl	2,0 mM
Koffein	5,0 mM
EDTA	1,0 mM
β-Mercaptoethanol	12 %
β-Mercaptoethanol DMSO	0,4 %
[ <sup>32</sup> P]-Phosphorylase a	4-5 μM

pH auf 7,4 einstellen.

Substanz	Menge
Tris ultra pur	3,0285 g
ddH <sub>2</sub> O	500 ml

Tabelle 22: 50mM Tris-Puffer (+Phosphostop und Proteaseinhibitor, PP).

pH mit HCl auf 7,4 einstellen.

Der Tris-Puffer wurde mit Phosphostop-Reagenz (Roche, Basel, Schweiz) und einem Proteaseinhibtor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) versetzt.

#### Tabelle 23: 2,5% SDS Proben Puffer + DTT.

Substanz	Menge
Tris ultra pur	1,89 g
SDS	12,5 g
Glycerol	50 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml

pH auf 6,8 einstellen.

1 ml der 2,5% SDS Probenpuffer auf 6 mg Dithiothreitol (DTT) plus one geben.

#### Tabelle 24: 5% SDS Probenpuffer +DTT.

Substanz	Menge
Tris ultra pur	1,89 g
SDS	6,25 g
Glycerol	50 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
ddH <sub>2</sub> O	ad 250 ml

pH auf 6,8 einstellen.

1 ml der 5% SDS Probepuffer auf 6 mg Dithiothreitol (DTT) plus one geben.

#### Tabelle 25: 4x konzentrierter Elektrode Puffer.

Substanz	Menge
Tris ultrapure	50,00 g
Glycine	90,00 g
SDS	8,00 g
ddH2O	ad 2 1

pH kontrollieren, sollte bei etwa 8,8 liegen.

#### Tabelle 26: Ponceau Lösung.

Substanz	Menge
Ponceau	0,1 g
Eisessig	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

#### Tabelle 27: Puffer A.

Substanz	Menge
Tris	24,2 g
NaCl	80 g

pH auf 7,4 einstellen.

#### Tabelle 28: Puffer C.

Substanz	Menge
Tris	24,2 g
NaCl	80 g
Tween 20	1 ml

pH auf 7,4 einstellen.

#### Tabelle 29: Fixierlösung ProQ.

Substanz	Menge
Methanol	500 ml
Eisessig	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	400 ml

#### Tabelle 30: Entfärbelösung ProQ.

Substanz	Menge
1 M Natriumacetat (pH 4,0)	50 ml
Acetonitrile	200 ml
ddH <sub>2</sub> O	750 ml

#### Tabelle 31: Entfärbelösung Sypro Ruby.

Substanz	Menge
Methanol	100 ml
Eisessig	70 ml
ddH <sub>2</sub> O	830 ml

#### Tabelle 32: Färbelösung Coomassie Blau.

Substanz	Menge
Coomassie Brillant Blau G250 (Merck)	2,5 g
Methanol	400 ml
Eisessig 96%	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	500 ml

#### Tabelle 33: Entfärbelösung Coomassie Blau.

Substanz	Menge
Methanol	300 ml
Eisessig	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	600 ml

## 9 Literaturverzeichnis

- Agostinis P, Goriss J, Waelkens E, Pinna LA, Marchiorill F (1987) Dephosphorylation of Phosphoproteins and Synthetic Phosphopeptides. J Biol Chem 262: 1060–1064
- Agostinis P, Derua R, Sarno S, Goris J, Merlevede W (1992) Specificity of the polycationstimulated (type-2A) and ATP, Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. FEBS J 205: 241–248
- Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P, Nairn AC (2007) Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. Proc Nat. Acad Sci USA 104: 2979–2984
- Ahn JH, Kim Y, Kim HS, Greengard P, Nairn AC (2011) Protein kinase C-dependent dephosphorylation of tyrosine hydroxylase requires the B56δ heterotrimeric form of protein phosphatase 2A. PLoS One 6: 1-7
- Aoyagi T, Momomura S, Serizawa T, Lizuka M, Ohya T, Sugimoto T (1991) Alphaadrenoceptor-mediated inotropism and beta-adrenoceptor-mediated inotropism in isolated rabbit ventricles: a comparison in mechanical effects and energetic efficiency. J Cardiovasc Pharmacol 4: 647–655
- Arino J, Woon CW, Brautigan DL, Miller TB, Johnson GL (1988) Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4252–4256
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H (1996) Protein phosphorylation is isolated trabeulae from nonfailing and failing human hearts. Mol Cell Biochem 157: 171–179
- Behere S, und Weindling S (2015) Inherited arrhythmias: The cardiac Channelopathies. Ann Pediatr Cardiol 8: 210–220
- Bialojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin , okadaic acid , protein phosphatases. Biochem J 256: 283–290
- Bokník P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 362: 222–231
- Bootman MD, Smyrnias I, Thul R, Coombes S, Roderick HL (2011) Atrial cardiomyocyte calcium signalling. BBA Mol Cell Res 1813: 922–934
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248–254.

- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molketing JD (2004) PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. Nature Med 10: 248–254
- Buchner K (2000) The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. J Cancer Res Clin Oncol 126: 1–11
- Burkart EM, Sumandea MP, Tomoyoshi K, Nili M, Martin AF, Homsher E, Solaro RJ (2003) Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. J Biol Chem 278: 11265–11272
- Castagnag M, Takai Y, Kaibuchi K, Kimihiko S, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct Activation of Calcium-sctivated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumorpromoting Phorbol Esters. J Biol Chem 257: 7847–7851
- Chen J, Martin B, Brautigan D (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. Science 257: 1261–1264
- Cho US, Xu W (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. Nature 445: 53–57
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatase. Annu Rev Biochem 58: 453–508
- Cohen P, Cohen PT (1989) Protein phosphatases come of age. J Biol Chem 264: 21435-8.
- Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng T L, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. Science 233: 859–866
- Csortos C, Zolnierowicz S, Bako E, Durbin S, DePaoli-Roach AA (1996) High Complexity in the Expression of the B' Subunit of Protein Phosphatase 2A<sub>0</sub>. J Biol Chem 271: 2578–2588
- Davare MA, Horne MC, Hell JW (2000) Protein phosphatase 2A is associated with class C Ltype calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMPdependent protein kinase. J Biol Chem 275: 39710–7
- Degrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, Murphy N, Killic A, Higgins R, Binkley PF, Boyden PA, Carnes CA, Anderson MT, Hund TJ, Mohler PJ (2013) Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. J Biol Chem 288: 1032–1046
- DePaoli-Roach AA (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F(A)/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). J Biol Chem 259: 12144–12152

- DePaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csortos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. Adv Enzyme Regul 34: 199–224
- Dobson JG, Shea LG, Fenton RA (2008) Adenosine A 2A and β-adrenergic calcium transient and contractile responses in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H2364–H2372
- Dozier C, Bonyadi M, Baricault L, Tonasso L, Darbon JM (2004) Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. Biol Cell 96: 509–517
- Erdodi F, Csortos C, Bot G, Gergely P (1985) Separation of rabbit liver latent and spontaneously active phosphorylse phosphatases by chromatography on heparin-sepharose. Biochem Biophys Res Com 128: 705–712
- Erkasap N (2007) SERCA in genesis of arrhythmias: what we already know and what is new? Anatol J Cardiol 10: 43–46
- Fink M, Niederer SA, Cherry EM, Fenton FH, Koivumäki JT, Seemann G, Thul R, Zhang H, Sachse FB, Beard C, Crampin EJ, Smith NP (2011) Cardiac cell modelling: Observations from the heart of the cardiac physiome project. Prog Biophys Mol Biol 104: 2–21
- Goris J, Merlevede W (1988) Isolation of an active form of the ATP + Mg2 + -dependent protein phosphatase stimulated by the deinhibitor protein and by p-nitrophenyl phosphate. Biochem J 254: 501–507
- Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT (1996) α1-adrenergic receptor subtypes Molecular structure, function, and signaling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 78: 737– 749
- Grimm M, Haas P, Willipinski-Stapelfeldt B, Zimmermann WH, Rau T, Pantel K, Weyand M, Eschenhagen T (2005) Key role of myosin light chain (MLC) kinase-mediated MLC2a phosphorylation in the  $\alpha_1$ -adrenergic positive inotropic effect in human atrium. Cardiovasc Res 65: 211–220
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. Cell 96: 99–110
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Kalzium indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260: 3440–3450
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. J Biol Chem 266: 9180–9185
- Guo H, Damuni Z (1993) Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. Proc Natl Acad Sci USA 90: 2500–2504

- Habertheuer A, Kocher A, Laufer G, Andreas M, Szeto WY, Petzelbauer P, Ehrlich M, Wiedemann D (2014) Cardioprotection: A review of current practice in global ischemia and future translational perspective. BioMed Res Int 2014: 1–11
- Hamilton WF (1960) Frank, Henderson, and Starling. Am Heart J 59: 803-806
- Hirano S, Kusakari Y, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Kurihara S (2006) Intracellular mechanism of the negative inotropic effect induced by alpha1-adrenoceptor stimulation in mouse myocardium. J Physiol Sci 56: 297–304
- Ingebritsen TS, Stewart AA, Cohen P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Eur J Biochem FEBS 132: 297–307
- Invitrogen (2010) Pro-Q ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain.
- Janssens V, Goris J (2001) Potein phosphatase 2 A: a highly regulated family of serine/ threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J 353: 417– 439
- Jideama NM, Noland TA, Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG, Blumberg PM, Yusuv AH, Kuo JF (1996) Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. J Biol Chem 271: 23277–23283
- Johnstone RH, Chang ETY, Bardenet R, Boer TPD, Gavaghan DJ, Pathmanathan P, Clayton RH, Mirams GR (2015) Uncertainty and variability in models of the cardiac action potential: Can we build trustworthy models? J Mol Cell Cardiol doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.018., im Druck
- Ke Y, Wang L, Pyle WG, de Tombe PP, Solaro RJ (2004) Intracellular localization and functional effects of P21-activated kinase-1 (Pak1) in cardiac myocytes. Circ Res 94: 194–200
- Kirchhefer U, Klimas J, Baba HA, Buchwalow IB, Fabritz L, Hüls M, Matus M, Müller FU, Schmitz W, Neumann J (2007) Triadin is a critical determinant of cellular Ca cycling and contractility in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H3165–H3174
- Kirchhefer U, Heinick A, König S, Kristensen T, Müller FU, Seidl MD, Boknik P (2014) Protein phosphatase 2A is regulated by protein kinase Cα (PKCα)-dependent phosphorylation of its targeting subunit B56α at Ser41. J Biol Chem 289: 163–176
- Kirchhefer U, Brekle C, Eskandar J, Isensee G, Kučerová D, Müller FU, Pinet F, Schlute JS, Seidl MD, Boknik P (2014) Cardiac Function Is Regulated by B56α-mediated Targeting of Protein Phosphatase 2A (PP2A) to Contractile Relevant Substrates. J Biol Chem 289: 33862–33873
- Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N (2014) Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. J Physiol Sci 64: 221–232

- Kohl C, Schmitz W, Scholz H, Scholz J (1990) Evidence for the existence of inositol tetrakisphosphate in mammalian heart. Effect of alpha 1-adrenoceptor stimulation. Circ Res 66: 580–583
- Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, Remedios CD, Stienen GJM, Van Der Velden J (2009). Protein kinase C α and ε phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca<sup>2+</sup> sensitivity in human myocardium. Basic Res Cardiol 105: 289–300
- Kotlo K, Xing Y, Lather S, Grillon JM, Johnson K, Skidgel RA, Solaro RJ, Danziger RS (2014) PR65A phosphorylation regulates PP2A complex signaling. PloS One 9: 1–9
- Kremmer E, Ohst KIM, Kiefer J, Brewis N (1997) Separation of PP2A Core Enzyme and Holoenzyme with Monoclonal Antibodies against the Regulatory A Subunit : Abundant Expression of Both Forms in Cells. Mol Cell Biol 17: 1692–1701
- Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. In Pflüger's Arch Ges Physiol 61: 291–331
- Layland J, Solaro RJ, Shah AM (2005) Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. Cardiovasc Res 66: 12–21
- Lee J, Chen Y, Tolstykh T, Stock J (1996) A specific protein carboxyl methylesterase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. Proc Natl Acad Sci USA 93: 6043–6047
- Letourneux C, Rocher G, Porteu F (2006) B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. EMBO J 25: 727–738
- Li C, Fultz ME, Geng W, Ohno S, Norton M, Wright GL (2001) Concentration-dependent phorbol stimulation of PKCα localization at the nucleus or subplasmalemma in A7r5 cells. Eur J Physiol 443: 38–47
- Liou JS, Chen CY, Chen JS, Faller DV (2000) Oncogenic ras mediates apoptosis in response to protein kinase C inhibition through the generation of reactive oxygen species. J Biol Chem 275: 39001–39011
- Liu Q, Hofmann PA (2003) Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H97– H103
- Lüss I, Boknik P, Jones LR, Kirchhefer U, Linck B, Lüss H, Meissner A, Müller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J (1999) Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species. J Mol Cell Cardiol 31: 1299–1314
- Lüss H, Herzig S, Klein-Wiele O, Boknık P, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J (2000) Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. J Mol Cell Cardiol 32: 2349–2359

- Mackay HJ, Twelves CJ (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? Nature 7: 554–562
- Martin K, Steinberg TH, Cooley LA, Gee KR, Beechem JM, Patton WF (2003) Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. Proteomics 3: 1244–1255
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. Cell 101: 365–376
- McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. J Biol Chem 271: 22081–22089
- Moore SF, van den Bosch MTJ, Hunter RW, Sakamoto K, Poole AW, Hers I (2013) Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) $\alpha/\beta$  by protein kinase C (PKC) $\alpha$  and Akt promotes thrombin-mediated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation and granule secretion in platelets. J Biol Chem 288: 3918–3928
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 262: 56-61
- Nakashima M, Maeda K, Sekiya A, Hagino Y (1971) Effect of hypothyroid status on myocardial response to sympathomimetic drugs. Japan J Pharmacol 21: 819–825
- Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. Am J Physiol 265: H257–H266
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. J Mol Cell Cardiol 29: 265–272
- Niggli E (2015) IP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> signals in the heart: boost them or bust them? J Physiol 6: 1385–1386
- Noble D (1962) A modification of the hodgkin-huxley equations applicable to purkunje fibre action and pace-maker potentials. J Physiol 160: 317–352
- Noland TA, Raynor RL, Kuo JF (1989) Identification of sites phosphorylated in bovine cardiac troponin I and troponin T by protein kinase C and comparative substrate activity of synthetic peptides containing the phosphorylation sites. J Biol Chem 264: 20778–20785
- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y (1987) Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. FEBS Letters 226: 125–128

- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y (1988) The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. J Biol Chem 263: 6927–6932
- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y (1989) Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3099–3103
- Osada S, Mizuno K, Saido TC, Akita Y, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S (1990) A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. J Biol Chem 265: 22434–22440
- Parker PJ, Coussens L, Toncy N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A (1986) The complete primary structure of protein C- the major phorbol ester receptor. Science 233: 853–859
- Pelech S, Cohen P (1985) The protein phosphatases involved in cellular regulation. Eur J Biochem FEBS 251: 245–251
- Priori SG, Chen W (2011) Inherited dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Handling and Arrhythmogenesis. Circ Res 108: 871–883
- Puglisi JL, Yuan W, Timofeyev V, Myers RE, Chiamvimonvat N, Samarel AM, Bers DM (2011) Phorbol ester and endothelin-1 alter functional expression of Na<sup>+</sup>/ Ca <sup>2+</sup> exchange, K<sup>+</sup>, and Ca <sup>2+</sup> currents in cultured neonatal rat myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 300: H617–H626
- Ricciarelli R, Azzi A (1998) Regulation of recombinant PKC activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. Arch Biochem Biophys 355: 197–200
- Roman BB, Goldspink PH, Spaite E, Urboniene D, McKinney R, Geenen DL, Solaro RJ, Buttrick PM (2004) Inhibition of PKC phosphorylation of cTnI improves cardiac performance in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H2089–H2095
- Scott J, Schlender KK (1988) Histone HI phosphorylated by protein kinase C is a selective substrate for the assay of protein phosphatase 2A in the presence of phosphatase 1. Biochim Biophys acta 967: 11–16
- Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JHB, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie Z-J (2015) Na+/Ca2+exchange and Na+/K+-ATPase in the heart. J Physiol 593: 1361–1382
- Shouse GP, Nobumori Y, Panowicz MJ, Liu X (2011) ATM-mediated phosphorylation activates the tumor-suppressive function of B56γ-PP2A. Oncogene 30: 3755–3765

- Spurgeon HA, DuBell WH, Stern MD, Sollott SJ, Ziman BD, Silverman HS, Caprogossi MV, Talo A, Lakatta EG (1992) Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. J Physiol 447: 83–102
- Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF (2003) Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. Proteomics 3: 1128–1144
- Steinfath M, Chen Y-Y, Lavicky J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H (1992) Cardiac α1-adrenoceptor densities in different mammalian species. Br J Phamacol 107: 185–188
- Stewart AA, Ingebritsen TS, Cohen P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation 5. purification of properties of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. Eur J Biochem FEBS 132: 289–295
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. Physiol Rev 79: 1089–1125
- Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. Biochem Biophys Res Com 91: 1281–1224
- Torp KD, Tschakovsky ME, Halliwill JR, Minson CT, Joyner MJ, (2001) β -Receptor agonist activity of phenylephrine in the human forearm. J Appl Physiol 90: 1855–1859
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Ross J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350–4354
- Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature 290: 527–528
- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. J Cell Biol 94: 325–334
- Usui H, Imazu M, Maeta K, Tsukamoto H, Azuma K, Takedas M (1988) Three distinct Forms of type 2A protein phosphatase in human erythrocyte cytosol. J Biol Chem 263: 3752–3761
- Vangheluwe P, Sipido KR, Raeymaekers L, Wuytack F (2006) New perspectives on the role of SERCA2's Ca<sup>2+</sup> affinity in cardiac function. Biochim Biophys acta 1763: 1216–1228
- Virshup DM (2000) Protein phosphatase 2A: A panoply of enzymes. Curr Opin Cell Biol 12: 180–185
- Vites A-M, Pappano A (1990) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases intracellular Ca<sup>2+</sup> in permeabilized chick atria. Am J Physiol 258: H1745–H1752

- Ward CA, Moffat MP (1992) Positive and negative inotropic effects of phorbol 12-myristate 13-acetate: relationship to PKC-dependence and changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . J Mol Cell Cardiol 24: 937–948
- Woo SH, Lee CO (1999) Role of PKC in the effects of alpha 1 -adrenergic stimulation on Ca<sup>2+</sup> transients, contraction and Ca<sup>2+</sup> current in guinea-pig ventricular myocytes. Pflüg Arch Eur J Physiol 437: 335–344
- Xu Z, Williams BRG (2000) The B56α regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. Mol Cell Biol 20: 5285–5299
- Yasuda I, Kishimoto A, Tanaka S, Tominaga M, Sakurai A, Nishizuka Y (1990) A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. Biochem Biophys Res Com 166: 1220–1227
- Ytrehus K, Downey JM, Liu Y (1994) Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol 266: 1145 1152

# 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1: KALZIUMSTROM IM KARDIOMYOZYTEN.	6
ABBILDUNG 2: PROTEINPHOSPHATASE 2A (PP2A)	9
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PP2A-REGULATION DURCH PKC-ABHÄNGIGE	
Phosphorylierung von B56α	
ABBILDUNG 4: STRUKTURFOMEL VON PHENYLEPHRIN IM VERGLEICH ZUR STRUKTURFORMEL VON	
Adrenalin	
ABBILDUNG 5: STRUKTURFORMELN VON DIACYLGLYCEROL (DAG) UND PHORBOL-12-MYRISTAT-13-ACET	AT
(PMA)	14
Abbildung 6: Genotypisierung der Mäuse	18
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DER KORREKT PLATZIERTEN KANÜLE IM HERZEN	18
ABBILDUNG 8: ABBILDUNG EINES KANÜLIERTEN HERZENS	18
ABBILDUNG 9: LANGENDORFF-APPARATUR	19
ABBILDUNG 10: GRAPHISCHE DARSTELLUNG EINES KALZIUMTRANSIENTEN.	21
Abbildung 11: Fluoreszenz-Spektren von Indo-1	21
Abbildung12: Graphische Darstellung der Sarkomerlängen-Verkürzung.	22
Abbildung 13: Darstellung eines Organbades	25
Abbildung 14: Frank Starling Mechanismus	25
Abbildung 15: Kontraktionskraft	
Abbildung 16: Standard-Protein-Verdünnungskurve	27
Abbildung 17: Okadasäure-Hemmkurve	30
ABBILDUNG 18: ZUSAMMENBAU DES BLOTTINGRAHMENS	33
ABBILDUNG 19: ECL REAKTION	35
ABBILDUNG 20: EMISSIONS UND EXZITATIONSSPEKTREN VON PROQ DIAMOND	36
ABBILDUNG 21: BEISPIEL BLOT PROQ DIAMOND (A) UND SYPRO RUBY (B)	37
ABBILDUNG 22: PHENYLEPHRIN-KWK FÜR SARKOMERLÄNGEN–VERKÜRZUNG	40
ABBILDUNG 23: PHENYLEPHRIN-KWK FÜR $\Delta$ [CA] <sub>1</sub>	41
ABBILDUNG 24: PHENYLEPHRIN-KWK FÜR 50%IGEN ABFALL DER SL-VERKÜRZUNG	42
ABBILDUNG 25: PHENYLEPHRIN-KWK FÜR KALZIUM-TRANSIENTENABFALL VON 50%	43
Abbildung 26: Kalzium-Sensitivität von Wildtyp-Kardiomyozyten unter basalen und	
STIMULIERTEN ( $10^{-5}$ M PE) BEDINGUNGEN	44
ABBILDUNG 27: SL-VERKÜRZUNG UNTER PHENYLEPHRIN-GABE MIT UND OHNE ISOPRENALIN-GABE	45
Abbildung 28: Maximale intrazelluläre Peakamplitude der Kalzium-Transienten ( $\Delta$ [Ca] <sub>1</sub> )	
UNTER PHENYLEPHRIN-EINFLUSS MIT UND OHNE ISOPRENALIN-GABE	46
Abbildung 29: Zeit bis zum Abfall der SL-Verkürzung um 50% unter PE mit und ohne	
ISOPRENALIN-APPLIKATION	47
Abbildung 30: Zeit bis zum 90%-igen Abfall der SL-Verkürzung unter Phenylephrin mit und	
OHNE ISOPRENALIN-GABE	
ABBILDUNG 31: ZEIT BIS ZU EINEM [CA],ABFALL UM 50% UNTER PE MIT UND OHNE ISOPRENALIN-GABE	49
--	----
ABBILDUNG 32: BASALE UND MAXIMALE PKC-AKTIVITÄT	50
ABBILDUNG 33: SL-VERKÜRZUNG UNTER BASALEN BEDINGUNGEN SOWIE NACH STIMULATION MIT PMA	
UND PMA+PE	51
$Abbildung \ 34: \Delta [Ca]_i \ unter \ basalen \ Bedingungen \ sowie \ nach \ PMA- \ und \ PMA+PE-Stimulation \$	52
ABBILDUNG 35: PE-KWK FÜR SL-VERKÜRZUNG UNTER 60-MINÜTIGER VORSTIMULATION MIT PMA	53
Abbildung 36: PE-KWK für $\Delta$ [Ca] <sub>1</sub> unter 60-minütiger PMA-Vorstimulation.	54
ABBILDUNG 37: PE-KWK FÜR DEN HALBMAXIMALEN ABFALL DER SL-VERKÜRZUNGNACH PMA-	
VORSTIMULATION	55
ABBILDUNG 38: PE-KWK FÜR 90%-IGE RELAXATION NACH PMA-VORSTIUMLATION	56
$ABBILDUNG  39: PE-KWK \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ $	57
ABBILDUNG 40: ZEIT BIS ZUM 50%IGEN ABFALL DER SL-VERKÜRZUNG NACH STIMULATION MIT PMA UND	
ANSCHLIEßENDER KOMBINIERTER GABE VON PMA UND PE	58
$Abbildung  41: Zeit  \text{Bis}  50\% \text{igem}  Abfall \ \text{Von}  [Ca]_{\scriptscriptstyle I}  \text{Nach Stimulation mit}  PMA  \text{und}  \text{Anschliebender}$	
ZUSÄTZLICHER GABE VON PMA	59
Abbildung 42: Verhältnis von Peakamplitude der Kalzium-Transienten zur SL-Verkürzung in	
WILDTYP-HERZMUSKELZELLEN UNTER BASALEN BEDINGUNGEN UND UNTER APPLIKATION	
VON SOWOHL $10^{-7}$ M PMA ALS AUCH $10^{-7}$ M PMA und $10^{-5}$ M PE	60
ABBILDUNG 43: KRAFTMESSUNG DER LINKEN ATRIEN IM ORGANBAD	61
ABBILDUNG 44: KONTRAKTIONSKRAFT DER LINKEN ATRIEN IM ORGANBAD	62
Abbildung 45: Phosphataseaktivität nach Stimulation mit $10^{-4}$ M PE	63
ABBILDUNG 46: PROTEINPHOSPHATASE-AKTIVITÄT NACH PMA-GABE	64
ABBILDUNG 47: PP-AKTIVITÄT NACH STIMULATION MIT PE UND PMA	65
ABBILDUNG 48: PROTEINPHOSPHATASE (PP)-AKTIVITÄT IN LINKEN ATRIEN NACH INKUBATION MIT PE	
ODER PE MIT PMA	66
Abbildung 49: Nachweis der Expression von $B56\alpha$ in Kardiomyozyten mittels Coomassie-	
Färbung	67
Abbildung 50: Nachweis der Expression von $B56\alpha$ in Kardiomyozyten mittels Immunoblotting	68
Abbildung 51: Phosphorylierungsgrad von B56 $\alpha$ in Kardiomyozyten	69
Abbildung 52: Expression von B56 $lpha$ in Immunpräzipitaten von linken Vorhof-Homogenaten	
UNTER BASALEN BEDINGUNGEN UND NACH KOMBINIERTER STIMULATION MIT PE UND PMA	
MIT HILFE VON COOMASSIE-FÄRBUNGEN	70
Abbildung 53: Proteinexpression von $B56\alpha$ in linken atrialen Homogenaten nach	
Immunpräzipitation unter basalen Bedingungen und nach PE- und PMA-	
STIMULATION.	71
Abbildung 54: Phosphorylierungszustand von B56 $\alpha$ unter basalen Bedingungen und nach	
STIMULATION MIT $10^{-4}$ M PE und $10^{-7}$ M PMA in Immunpräzipitaten linker Vorhof-	
Homogenate	72
ABBILDUNG 55: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR HYPOTHETISCHEN REGULATION DER KARDIALEN	
Kontraktionskraft über eine PKC-abhängige Phosphorylierung von B56 $lpha$	74

TABELLE 1: GEBRÄUCHLICHE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINPHOSPHATASEN	N
(modifiziert nach (Cohen 1989)	
TABELLE 2: NID-PUFFER	
TABELLE 3: PCR-PROGRAMM	
TABELLE 4: 1%IGES AGAROSE-GEL	
TABELLE 5: 50x TAE-Puffer	
TABELLE 6: CHEMIKALIEN ZUR HERSTELLUNG DES PERFUNSIONSPUFFERS	
TABELLE 7: HERSTELLUNG DER PERFUSIONSPUFFER-STAMMLÖSUNG	
TABELLE 8: PERFUSIONSPUFFER	
TABELLE 9: ENZYMLÖSUNG	
TABELLE 10: STOPPLÖSUNG 1	89
TABELLE 11: STOPPLÖSUNG 2	
TABELLE 12: CHEMIKALIEN ZUR KALZIUMSTRANSIENTENBESTIMMUNG	
TABELLE 13: LAGERLÖSUNG	
TABELLE 14: 5x Kalzium freie Tyrode	
TABELLE 15: TYRODE	
TABELLE 16: INDOLÖSUNG	
TABELLE 17: STAMMREAGENZIEN ZUR KONTRAKTIONSKRAFTMESSUNG	
TABELLE 18: CHEMIKALIEN FÜR DIE BIOCHEMIE	
TABELLE 19: INKUBATIONSLÖSUNG	
TABELLE 20: DIALYSEPUFFER	
TABELLE 21: PHOSPHORYLASE A ENTHALTENDE LÖSUNG	
TABELLE 22: 50 MM TRIS-PUFFER (+PHOSPHOSTOP UND PROTEASEINHIBITOR, PP)	
TABELLE 23: 2,5% SDS PROBEN PUFFER + DTT.	
TABELLE 24: 5% SDS PROBENPUFFER +DTT	
TABELLE 25: 4X KONZENTRIERTER ELEKTRODE PUFFER	
TABELLE 26: PONCEAU LÖSUNG	
TABELLE 27: PUFFER A	
TABELLE 28: PUFFER C	
TABELLE 29: FIXIERLÖSUNG PROQ	
TABELLE 30: ENTFÄRBELÖSUNG PROQ	
TABELLE 31: ENTFÄRBELÖSUNG SYPRO RUBY	
TABELLE 32: FÄRBELÖSUNG COOMASSIE BLAU	
TABELLE 33: ENTFÄRBELÖSUNG COOMASSIE BLAU	

## 11 Publikations- und Präsentationsverzeichnis

- Kirchhefer U, Brekle C, Eskandar J, Isensee G, Kučerová D, Müller FU, Pinet F, Schlute JS, Seidl MD, Boknik P (2014) Cardiac Function Is Regulated by B56α-mediated Targeting of Protein Phosphatase 2A (PP2A) to Contractile Relevant Substrates. J Biol Chem 289: 33862–33873
- Posterpräsentation auf der 81sten Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) am 11.03.2015 in Kiel. Das Poster trug den Titel: The positive inotropic effect after PKC stimulation is accompanied by a decrease in PP2A activity.

## 12 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinen Eltern und meiner geliebten Schwester für ihre anhaltende Unterstützung und die Bereitschaft, mir den Rücken von jeglichen Beeinträchtigungen meiner Arbeit freizuhalten. Vor allem meine Mutter wusste mich ausdauernd und liebevoll zu motivieren.

Großes Verständnis nötigte ich meinem Partner Timo ab, wenn ich morgens gegen 4 Uhr ins Labor aufbrach, was er häufig sogar am Sonntag hinnehmen musste.

Mit unglaublich positiver Einstellung, offenem Ohr für Probleme in meiner Versuchsreihe und Lösungen für alle Fälle hat mir Nicole Hinsenhofen als technische Assistentin immer wieder weitergeholfen.

Rund um die Uhr stand mir Beatrix Scholz zur Seite und ließ mich bei meinen Experimenten an ihrer Erfahrung als Diplom-Chemikerin teilhaben.

Sprachliche Anregungen und gelegentliche Beratung zur Textgestalt dieser Arbeit erfuhr ich durch den Freund der Familie Klaus Thoss aus seiner langjährigen gymnasialen Tätigkeit als Deutschlehrer.

Ausdrücklich danke ich Herrn Professor Dr. Kirchhefer für seine Geduld und Muße, mit der er mir das experimentell-induktive Arbeiten näher gebracht, meine wissenschaftliche Entwicklung begleitet und zu jeder Tageszeit meine Fragen beantwortet hat. In fachlichem Gespräch und mit der Bereitschaft zur Diskussion hat er mich zum Entfalten eigenständiger Ideen motiviert. Zu besonderem Dank jedoch bin ihm verpflichtet, dass er mir dieses hochinteressante, spannende Thema für meine Dissertation überlassen hat.

Mein Dank gilt auch Professor Müller, der durch seine stets kritischen Anregungen eine besondere Art der Motivation in mir hervorgerufen hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Professor Amasheh für die spontane Übernahme der Erstkorrektur meiner Doktorarbeit danken.

## 13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

07.10.2016

Christiane Brekle