

Pharmakologie und Toxikologie

**Zur Bedeutung
der Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen 1 und 2A
im Herz-Kreislauf-System**

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

vorgelegt von
Thorsten Sascha Krause
Tierarzt
aus Münster (Westf.)

Berlin 2007
Journal-Nr.: 3164

Pharmakologie und Toxikologie

**Zur Bedeutung
der Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen 1 und 2A
im Herz-Kreislauf-System**

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

vorgelegt von
Thorsten Sascha Krause
Tierarzt
aus Münster (Westf.)

Berlin 2007
Journal-Nr.: 3164

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

Dekan: Prof. Dr. L. Brunnberg

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Fink

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Neumann

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Hartmann

Deskriptoren: Protein Phosphatase 1, Protein Phosphatase 2, protein phosphatase inhibitor-2, heart diseases, smooth muscle, myocardium, phosphoric monoester hydrolases

Tag der Promotion: 20.02.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster in der Zeit von August 2002 bis Dezember 2004 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. Neumann und Frau Prof. Dr. H. Fink angefertigt.

1. Einleitung	1
1.1. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens	1
1.2. Regulation der Kontraktionskraft des glatten Muskels	3
1.3. Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen	5
1.4. Hemmstoffe der Proteinphosphatasen	9
1.4.1. Endogene inhibitorische Proteine	9
1.4.2. Exogene Hemmstoffe	11
1.5. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System	12
2. Fragestellung	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Untersuchungsmaterial	16
3.1.1. Gewebe	16
3.1.2. Zellen	17
3.1.2.1. Zellkultur	17
3.1.2.2. Primäre Zellen	17
3.2. Zellkultur	17
3.2.1. Anzucht und Kultur von HEK ₂₉₃ -Zellen	17
3.2.2. Anzucht und Kultur von A ₇ R ₅ -Zellen	18
3.2.3. Isolation und Kultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten	18
3.2.4. Isolation und Kultur von vaskulären glatten Muskelzellen	19
3.2.5. Isolation und Kultur von adulten Rattenkardiomyozyten	19
3.2.6. Kryokonservierung von Zellen	19
3.3. Adenovirale Expressionssysteme	20
3.3.1. Amplifikation von Viren und Titerbestimmung	20
3.3.2. Infektion von HEK ₂₉₃ -Zellen	21
3.3.3. Infektion von A ₇ R ₅ -Zellen	21
3.3.4. Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten	21
3.3.5. Infektion vaskulärer glatter Muskelzellen	21
3.3.6. Infektion adulter Rattenkardiomyozyten	22
3.4. Arbeitstechniken mit DNA	22
3.4.1. Herstellung kompetenter Bakterien	22
3.4.2. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	23
3.4.3. Analytische Plasmidisolierung	23
3.4.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	24
3.4.5. Klonierungstechniken	24
3.4.5.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	24
3.4.5.2. Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden	24
3.4.5.3. Glätten von 3'- bzw. 5'-DNA-Überhängen	24
3.4.5.4. Agarosegelelektrophorese	25
3.4.5.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
3.4.5.6. Ligation	26
3.4.5.7. Sequenzierung von Plasmid-DNA	26
3.4.6. Amplifikation der strukturellen Untereinheit A α der PP2A mittels PCR	26
3.4.7. Herstellung transgener Mäuse mit einer herzmuskel-spezifischen Überexpression des Inhibitors 2 unter Kontrolle des α -MHC-Promotors	26
3.4.7.1. Generierung transgener Mäuse	27
3.4.7.2. Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik	27
3.4.8. Generierung transgener Mäuse mit einer herzmuskel-spezifischen Überexpression der strukturellen	27

Untereinheit A α der PP2A unter Kontrolle des α -MHC-Promotors	
3.4.9. Generierung transgener Mäuse mit einer glattmuskelspezifischen Überexpression des Inhibitor 2 unter Kontrolle des SM-MHC-Promotors	28
3.4.9.1. Generierung transgener Mäuse	28
3.4.9.2. Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik	29
3.4.10. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus	29
3.4.11. Nachweis des Transgens mittels PCR	29
3.5. Proteinchemische Arbeitstechniken	30
3.5.1. Herstellung der Homogenate	30
3.5.2. Proteinbestimmungen	31
3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.5.4. Western Blot-Verfahren	31
3.5.5. Immunologische Identifizierung von Proteinen	32
3.5.6. Immunfärbung	32
3.5.7. Autoradiographie	32
3.5.8. Quantifizierung der Proteinexpression	33
3.5.9. Immunhistologische Untersuchungen	33
3.6. Bestimmung der Phosphataseaktivität	34
3.6.1. Herstellung der Homogenate zur Messung der Phosphataseaktivität	34
3.6.2. Herstellung [³² P]-markierter Phosphorylase a	35
3.6.3. PP-Assay	35
3.7. Messung der Ca ²⁺ -Transienten	35
3.8. Statistische Auswertung	36
3.9. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Untersuchung der Proteinexpression in humanen Ventrikeln und Koronararterien	38
4.1.1. Untersuchung der PP2A _{Aα}	38
4.1.2. Untersuchung der PP2A _{B56α}	40
4.1.3. Untersuchung der PP2A _{Cα}	42
4.1.4. Untersuchung der PP1 _{Cα}	44
4.1.5. Untersuchung von CSQ	46
4.1.6. Untersuchung von PP2A _{B56α} in humanen Koronararterien	47
4.2. Herstellung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression des Inhibitors 2	48
4.2.1. Herstellung der transgenen Mäuse	48
4.2.2. Charakterisierung der Proteinexpression von transgenen α -MHC-I ₂ -full length-Mäusen (I ₂ -full length-Mäusen)	50
4.2.3. Immunhistologie von transgenen I ₂ -full length-Mäusen	54
4.2.4. Bestimmung der Phosphataseaktivität von I ₂ -full length-Mäusen	57
4.3. Untersuchung von I ₂ -Adenovirus infizierten Zellen	59
4.3.1. Neonatale Rattenkardiomyozyten	59
4.3.1.1. Immunhistologie	60
4.3.1.2. Bestimmung der Phosphataseaktivität	61
4.3.1.3. Messung der Calciumtransienten	63
4.3.2. Adulte Rattenkardiomyozyten	66
4.4. Generierung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression der strukturellen Untereinheit der PP2A	68
4.4.1. Klonierung der Expressionskassette	68
4.5. Generierung transgener Mäuse zur glattmuskelspezifischen Überexpression des Inhibitors 2	71
4.5.1. Klonierung der Expressionskassette	71

4.6. Untersuchung von I ₂ -Adenovirus infizierten Zellen	73
4.6.1. A ₇ R ₅ -Zellen	73
4.6.2. Vaskuläre glatte Muskelzellen (SMC)	76
5. Diskussion	79
5.1. Expression der Proteinphosphatasen Typ 1 und 2A in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz	81
5.2. Generierung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression der strukturellen Untereinheit A α der PP2A	85
5.3. Herzspezifische Überexpression des vollständigen I ₂ der PP1 in transgenen Mäusen	86
5.4. Adenovirale Expression des I ₂ der PP1	88
5.5. Glattmuskelspezifische Überexpression des vollständigen I ₂ der PP1 in transgenen Mäusen	92
5.6. Ausblick	94
6. Zusammenfassung	95
7. Summary	96
8. Anhänge	97
7.1. Chemikalien, Puffer und Lösungen	97
7.2. Antikörper	104
7.3. Geräte und Bezugsquellen	105
7.4. Primer und PCR-Programme	107
9. Literaturverzeichnis	109

%(m/V)	Massen-Volumen-Prozent = g Substanz in 100 ml Endprodukt
%(V/V)	Volumen-Prozent = ml Substanz in 100 ml Endprodukt
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AC	Adenylylcyclase
Amp	Ampicillinresistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
α -MHC	Promotor der schweren Kette des α -Myosins
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
[Ca ²⁺]	freie Kalziumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _i	freie, intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm (Calf intestinal alkaline phosphatase)
CPI-17	PKC-abhängiger Phosphataseinhibitor (17 kDa)
CS	Zytosol
CS1	katalytische Untereinheit der PP1
CSQ	Calsequestrin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECF	enhanced chemifluorescence (-substrat)
EF-2	Elongationsfaktor-2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
h	Stunde
H ₉ C ₂	kontinuierlich wachsende Zelllinie aus embryonalem Rattenmyokard
HEK ₂₉₃	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
I-1	Inhibitor-1 der Proteinphosphatase vom Typ 1
I-2	Inhibitor-2 der Proteinphosphatase vom Typ 1
IC ₅₀	Inhibitorische Konstante 50
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
JCT	Junctin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Ktr	Kontrolle
l	Liter
m	1. Meter 2. Milli (10 ⁻³)
M	molar (Mol/Liter)
mCi	Milli-Curie = 37 x 10 ⁶ Becquerel
MF	Myofilamente
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
min	Minute
MLC ₂₀	regulatorische leichte Kette des Myosins (20 kDa)
MLCK	Kinase der leichten Kette des Myosins
MLCP	Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MV	Membranvesikel
N	Normalität (Grammäquivalente pro Liter)

n	1. Stichprobenumfang 2. Nano (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau Tetrazolium
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OA	Okadasäure
OD	optische Dichte
p	1. probability (Wahrscheinlichkeit) 2. Piko (10^{-12})
P	Phosphor
^{32}P	Radionuklid des Phosphors
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCa	$-\log_{10} [\text{Ca}^{2+}]$
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	$-\log_{10} [\text{H}^+]$
PI-Einheiten	PhosphorImager-Einheiten
PK	Proteinkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLB	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Serin/Threonin-Proteinphosphatase
PP1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 1
PP2A	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 2A
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
rec.	rekombinant
Rgl	Glykogen-bindende, regulatorische Untereinheit der PP1
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkription
RyR	Ryanodin-Rezeptor

SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TG	transgen
Tn	Troponinkomplex
TnC	Calcium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
TRD	Triadin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
u	<i>unit</i> (Einheit)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
vs.	versus
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Mechanismus der Regulation zellulärer Prozesse. Etwa ein Drittel aller Proteine in einer Säugetierzelle können phosphoryliert werden (DePaoli Roach et al. 1994).

Die Phosphorylierung von Proteinen wird von phosphorylierenden Proteinkinasen und dephosphorylierenden Proteinphosphatasen reguliert. Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wird der Grad der Phosphorylierung von der Aktivität der Kinasen und Phosphatasen bestimmt. Durch Phosphorylierung ist eine Beeinflussung der Proteineigenschaften möglich in Form von: Hemmung oder Steigerung von Enzymaktivität, Zuordnung zu einem subzellulären Kompartiment und Beeinflussung von Interaktionen zwischen Proteinen. Dieser einfache, reversible Mechanismus post-translationaler Modifikation ermöglicht es der Zelle, ihre Eigenschaften schnell und flexibel den jeweiligen Erfordernissen anzupassen. Dies wird im Folgenden am Beispiel der Kontraktion des Herzens und des glatten Muskels verdeutlicht.

1.1. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens

Die elektrische Erregung der Oberflächenmembran der Herzmuskelzelle führt zu einem Aktionspotential. Dieses breitet sich wie eine Depolarisationswelle entlang der Zelloberfläche bis zum transversalen Tubulus (T-Tubulus) aus. Die Depolarisation der Membran innerhalb des T-Tubulus bedingt die Öffnung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol bewirkt nach Bindung an den Ryanodin-Rezeptor (Ca^{2+} -Freisetzungskanal) die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR, Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, Fabiato und Fabiato 1975, Sham et al. 1995). Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der Nähe des Ryanodin-Rezeptors und/oder ein erhöhter Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) führt zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors (Bers et al. 2002). Somit werden mehr Ca^{2+} -Ionen freigesetzt und diese binden an das Troponin C der Myofilamente. Dadurch wird die Kontraktion des Myokards ausgelöst (s. Abb. 1.1.). Während der Relaxation können die Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol entweder durch SERCA, die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, in das SR oder durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in den Extrazellularraum transportiert werden. Nach β -adrenerger Stimulation kommt es durch Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung regulatorischer Proteine der Herzmuskelzelle. Dazu gehört Phospholamban (PLB), ein regulatorisches Protein der SERCA. PLB wird durch die PKA an der Aminosäure Serin 16 (s. Abb. 1.1.) und durch eine Calcium-/Calmodulin-abhängige Proteinkinase an der Aminosäure

Threonin 17 phosphoryliert (Übersicht bei Simmerman und Jones 1998). Phosphoryliertes PLB erhöht die Affinität von SERCA für freies Ca^{2+} . Als Folge kann SERCA mehr Ca^{2+} in das SR transportieren. Das aufgenommene Ca^{2+} wird überwiegend an Calsequestrin (CSQ) gebunden (MacLennan und Wong 1971, Mitchell et al. 1988). Bei der nächsten Kontraktion kann somit mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden, was zu einer erhöhten Kontraktionskraft führt (positiv inotroper Effekt). Durch die schnellere Aufnahme des Ca^{2+} in das SR verkürzt sich darüber hinaus auch die Relaxationszeit (positiv lusitroper Effekt).

Neben PLB werden auch spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle und Ryanodin-Rezeptoren (RYR) nach β -adrenerger Stimulation durch PKA vermehrt phosphoryliert (Charnet et al. 1995, Rapundalo 1998). Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle steigt und es kann mehr Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum und dem SR in das Zytosol einströmen. Dies führt ebenfalls zu einer Kontraktionskraftsteigerung. Die Kontraktionskraft kann darüber hinaus auch durch Phosphorylierung verschiedener Proteine der Myofilamente reguliert werden. Mögliche Angriffspunkte der Kinasen sind der Troponinkomplex und die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC-2). Phosphorylierter Troponin-Inhibitor (TnI) inhibiert das Calcium-bindende Troponin (TnC). Dadurch wird die Affinität von TnC für Calcium verringert (Solaro et al. 1980). Dies resultiert in einer Beschleunigung der Relaxation (Zhang et al. 1995).

Um eine Anpassung der Herzkontraktion zu gewährleisten, müssen Phosphorylierungen auch rückgängig gemacht werden können. Durch Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen (im Folgenden nur Phosphatasen genannt) erfolgen diese Dephosphorylierungen.

Somit stellen die, durch Proteinkinasen bzw. Phosphatasen katalysierten, Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge einen wichtigen Mechanismus der posttranslationalen Modifikation regulatorischer Proteine des Herzens dar (Rapundalo 1998). Sie spielen daher bei der Kontraktion des Herzens eine bedeutende Rolle.

Die Phosphatasen vom Typ 1 und 2A werden im Abschnitt Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen (s. 1.3.) genauer beschrieben.

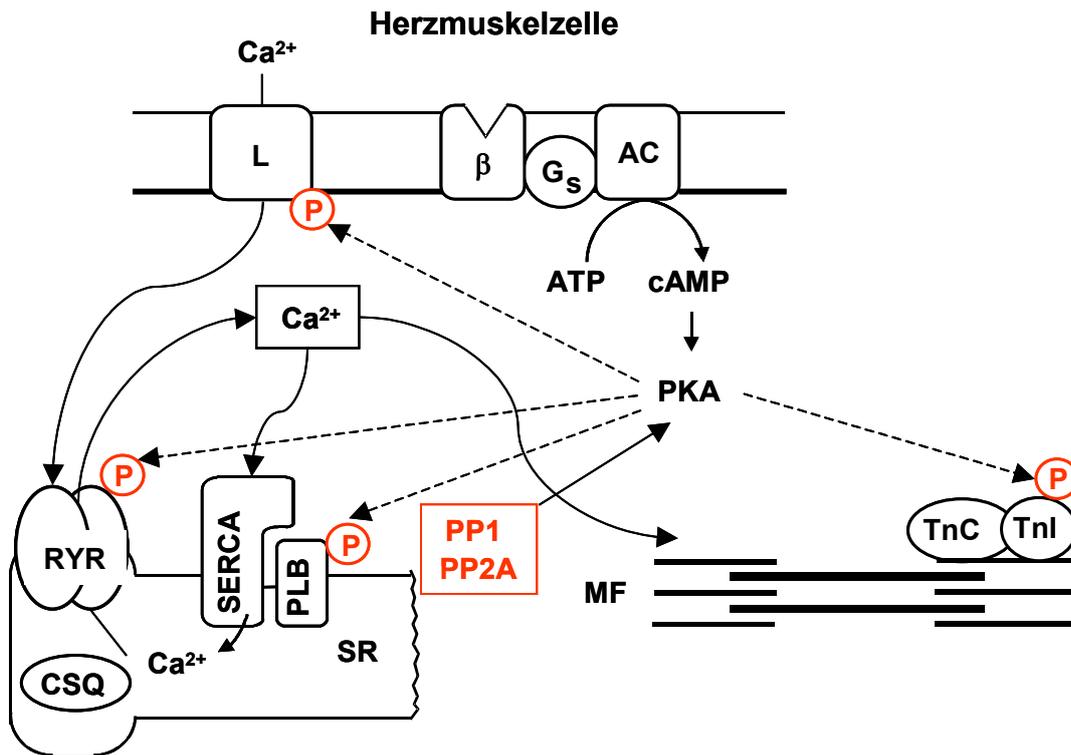


Abb. 1.1.: Schema zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase im Myokard

β -adrenerge Stimulation führt über ein stimulierendes G-Protein (G_s) zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase (AC). AC katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert u. a. Phospholamban (PLB), ein Protein des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Phosphoryliertes PLB erhöht die Affinität der Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) für freies Ca^{2+} . SERCA kann mehr Ca^{2+} in das SR transportieren, wo es zum größten Teil an Calsequestrin (CSQ) gebunden wird. Bei der Kontraktion kommt Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, triggert die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und bindet an regulatorische Proteine der Myofilamente (MF) wie z. B. den Troponin-Komplex. Zum Troponin-Komplex gehören das Calcium-bindende Troponin (TnC) sowie der Troponin-Inhibitor (TnI). Durch PKA phosphoryliertes TnI inhibiert TnC. Dadurch wird die Affinität von TnC für Calcium verringert. Die Proteophosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A) dephosphorylieren 90% der regulatorischen Proteine der Herzmuskelzelle und somit alle von der PKA phosphorylierten Proteine.

1.2. Regulation der Kontraktionskraft des glatten Muskels

Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch die Phosphorylierung der 20 kDa schweren regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC_{20} – myosin light chain) reguliert. Ein Komplex von Calmodulin (CaM) und Ca^{2+} aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Diese phosphoryliert die MLC_{20} und führt letztlich zur Kontraktion. Die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert die MLC_{20} . Die glatte Muskulatur relaxiert.

Der kontraktile Status der glatten Muskulatur wird primär durch die Konzentration an freiem intrazellulären Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) und daraus folgend dem Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} kontrolliert (s. Abb. 1.2., Somlyo und Somlyo 1994). Daraus folgt, dass die Kontraktionskraft der Glattmuskelzelle erhöht ist, wenn der Anteil phosphorylierter MLC_{20} erhöht ist. Dieser Effekt wird über eine Aktivierung der MLCK oder eine Hemmung der MLCP erreicht. Stimuli, wie Blutdruckabfall oder Adrenalinausschüttung, erhöhen $[Ca^{2+}]_i$, indem Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum durch spannungsabhängige oder Rezeptor-gekoppelte Calciumkanäle eintritt und/oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird (Morano 1992). Eine α -adrenerge Stimulation bewirkt über die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) eine IP_3 -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ werden die Ca^{2+} -Bindungsstellen des CaM abgesättigt. CaM ist an die MLCK gebunden (Bayley et al. 1996, Johnson et al. 1996). Wenn Ca^{2+} an CaM bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung der MLCK, wodurch dem Substrat Myosin der Zugang zur Kinase ermöglicht wird (Pearson et al. 1988, Rhoads und Friedberg 1997). Wenn die $[Ca^{2+}]_i$ des Ruhezustands erreicht wird, relaxiert die glatte Muskulatur. Vorher wird Ca^{2+} aus der Zelle entfernt oder wieder in das ER aufgenommen. Somit dissoziiert das Ca^{2+} vom CaM, und dies hat die Inaktivierung der MLCK zur Folge. Die MLC_{20} wird durch die MLCP dephosphoryliert, wodurch der Querbrückenzyklus unterbunden wird und die Muskulatur relaxiert (Erdödi et al. 1996).

Aus biochemischen Untersuchungen geht hervor, dass MLCP ein Trimer ist, welches aus der katalytischen Untereinheit der Typ 1 Phosphatase ($PP1_{Ca}$), einer Zieluntereinheit (MYPT1) und einer kleinen ca. 20 kDa großen Untereinheit (M20) besteht (Hartshorne und Erdödi 2004). Der Vorteil dieses Aufbaus ist, dass auf der einen Seite durch die Zieluntereinheit MYPT1 eine hohe Substratspezifität erreicht wird auf der anderen Seite mehr Möglichkeiten zur Regulierung der MLCP gegeben sind, z.B. durch Phosphorylierung oder veränderter Expression regulatorischer Untereinheiten. Es sind bisher mehr als 50 Zieluntereinheiten für $PP1_{Ca}$ gefunden worden und somit kann $PP1_{Ca}$ zudem an sehr vielen Zellprozessen teilhaben.

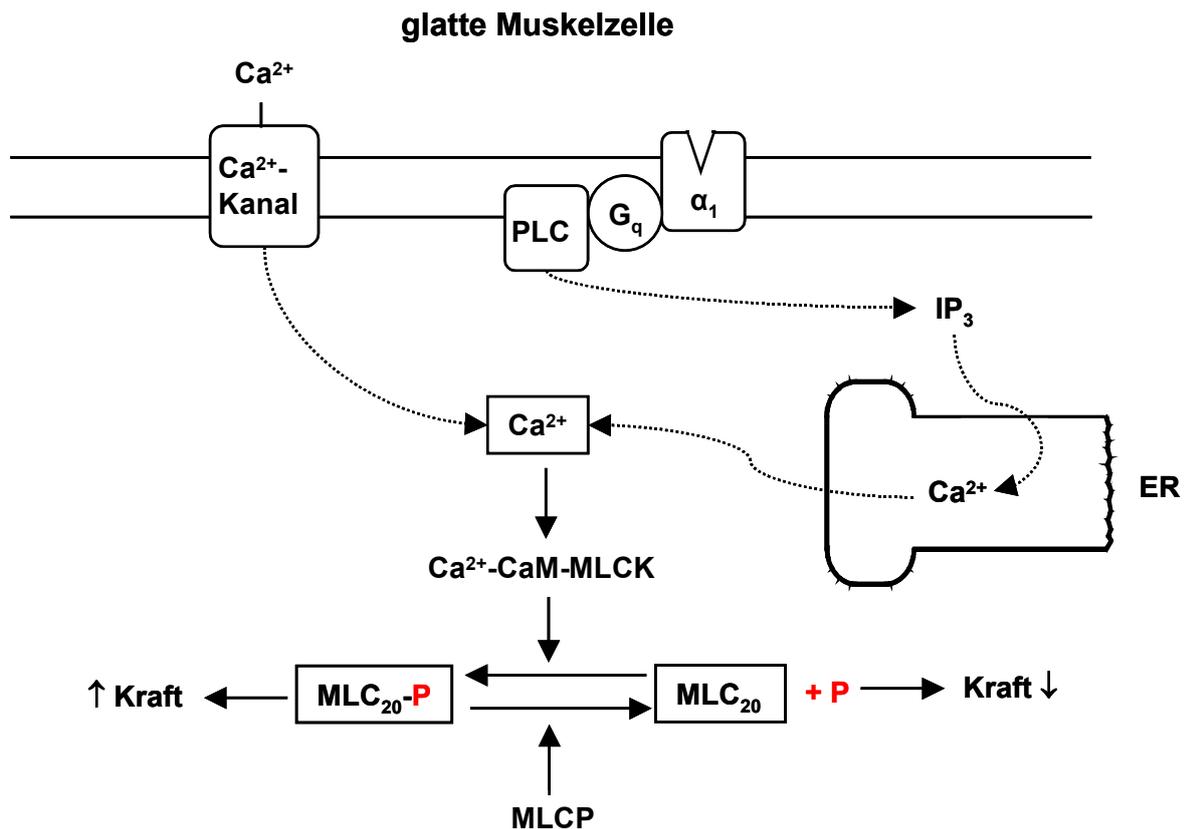


Abb. 1.2.: Schema zur Regulation des Gefäßtonus

Schematische Darstellung der Regulation der Kraftentwicklung im glatten Muskel. Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren (α_1) führt über ein G-Protein (G_q) und Phospholipase C (PLC) zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 setzt Calcium (Ca^{2+}) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) frei. Ca^{2+} bindet an Calmodulin (CaM), wodurch die Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) aktiviert wird. Die MLCK phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC_{20}), was den Querbrückenzyklus der Myofilamente und damit die Kraftentwicklung ermöglicht. Die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP) hebt die Phosphorylierung durch die MLCK auf und es kommt zur Relaxation. **P**: Phosphat.

1.3. Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Traditionell werden die Phospho-Serin und -Threonin dephosphorylierenden Proteinphosphatasen (PP) anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren in Typ 1 und Typ 2 PPs gegliedert (Cohen 1989, Cohen und Cohen 1989, Shenolikar und Nairn 1991). Die Typ 1 PPs werden durch die PP1-spezifischen inhibitorischen Proteine 1 (I_1) und 2 (I_2) gehemmt (s. 1.4.1.). Sie dephosphorylieren bevorzugt die β -Untereinheit der Phosphorylasekinase. Dagegen dephosphorylieren die Typ 2 PPs hauptsächlich die α -Untereinheit der Phosphorylasekinase und werden nicht durch I_1 oder I_2 in ihrer Aktivität gehemmt. Die Typ 2 PPs werden noch weiter in die Subtypen PP2A, PP2B und PP2C unterteilt. Darüber hinaus wurden in den

letzten Jahren vier zusätzliche PP-Typen identifiziert (Cohen 1997), diese sind: PP4 (Brewis et al. 1993), PP5 (Chen und Cohen 1997), PP6 (Bastians und Ponstingl 1996) und PP7 (Huang und Honkanen 1998). Die verschiedenen PP-Typen lassen sich aufgrund der Abhängigkeit ihrer katalytischen Aktivität von divalenten Kationen weiter charakterisieren. Die Aktivität der PP2B, PP2C und PP7 ist vollständig von divalenten Kationen abhängig, wohingegen PP1, PP2A, PP4 und PP5 katalytisch spontan aktiv sind. Die Aktivität der PP2B ist Ca^{2+} -abhängig, die PP2C benötigt Mg^{2+} (Herzig und Neumann 2000, Mumby und Walter 1993) und die PP7 ist Mg^{2+} -abhängig und wird durch Ca^{2+} aktiviert (Huang und Honkanen 1998). PP6 wurde bisher nicht biochemisch charakterisiert. Die primären Aminosäuresequenzen und soweit bekannt Kristallstrukturen der PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 und PP7 besitzen große Ähnlichkeiten und werden als sog. PPP-Genfamilie zusammengefaßt. Die PP2C hingegen unterscheidet sich von ihnen und bildet die sog. PPM-Genfamilie (Cohen 1997, 2002).

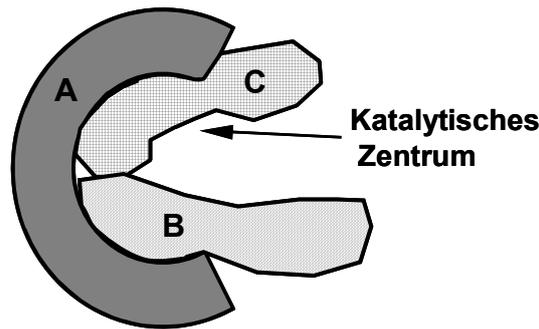
Die vier in Säugetierzellen nachgewiesenen PPs vom Typ 1 werden als PP1_α , PP1_β (syn. PP1_δ), PP1_{γ_1} und PP1_{γ_2} bezeichnet (Sasaki et al. 1990). Sie werden von drei Genen codiert, wobei die PP1_{γ_1} und PP1_{γ_2} *Spleiß*-Varianten eines Gens sind. Eine weitere PP1_α -Variante, PP1_{α_2} (Durfee et al. 1993, Yoshida et al. 1999), wurde beim Menschen gefunden, was darauf hindeutet, dass auch von dieser PP1 -Isoform mindestens zwei *Spleiß*-Varianten existieren. Die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen PP1 -Isoformen ist > 90%. Die Sequenzen der Isoformen sind zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert, z. B. ist die Homologie der PP1_α von Ratte, Maus und Kaninchen > 99%; PP1_α der Ratte und des Mensch sind identisch (Barker et al. 1990, Berndt et al. 1987, Kitamura et al. 1991, Sangrador et al. 1998). Bisher konnten die Kristallstrukturen der PP1_α und der PP1_{γ_1} aufgeklärt werden. Die PP1 ist danach ein globuläres Protein, dessen Oberfläche von drei Furchen - der hydrophoben Furche, der sauren Furche und der C-terminalen Furche - durchzogen wird. Das aktive Zentrum liegt im Kreuzungspunkt der drei Furchen (Egloff et al. 1995, Egloff et al. 1997, Goldberg et al. 1995). Im Folgenden ist mit der Bezeichnung Proteinphosphatase 1 (PP1) die katalytische Untereinheit der PP1 gemeint.

Die PP1 reguliert neben der Muskelkontraktion auch so unterschiedliche zelluläre Prozesse wie den Zellzyklusverlauf, die Proteinsynthese, den Kohlenhydratmetabolismus, die Transkription und die neuronale Signaltransduktion (Cohen 2002, Shenolikar und Nairn 1991, Wera und Hemmings 1995). Die Regulation dieser Vielfalt zellulärer Prozesse durch ein einzelnes Enzym gelingt aufgrund der Interaktion der PP1 mit mehr als 50 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten (Cohen 2002).

Die Interaktion der regulatorischen Untereinheiten erfolgt dabei mit der hydrophoben Furche auf der Oberfläche der PP1 über ein kurzes stark konserviertes Bindungsmotiv, dem RVxF-Motiv (Cohen 2002). Die meisten der regulatorischen Untereinheiten führen die PP1 einem spezifischen subzellulären Kompartiment zu. Regulatorische Untereinheiten der PP1 sind z.B. die Glykogen-bindenden Untereinheiten, GM und GL (Johnson et al. 1996), die Myosin-bindenden Untereinheiten M110-133 (Johnson et al. 1997), die regulatorischen Proteine des Zellkerns, mit dem Kerninhibitor der PP1 (NIPP-1, Beullens et al. 1999) und der nukleären regulatorischen Untereinheit der PP1 (PNUTS, Kim et al. 2003) sowie dem neuronalen Protein Neurabin I (McAvoy et al. 1999). Neben den regulatorischen Untereinheiten sind mehrere endogene inhibitorische Proteine bekannt, die ebenfalls zur Regulation der PP1-Aktivität beitragen (s. 1.4.1.).

In der glatten Muskulatur bildet PP1 zusammen mit einer 110-133 kDa Myosin-bindenden Untereinheit (MYPT1 [M₁₁₀₋₁₃₃: M₁₁₀ in der Aorta der Ratte, M₁₃₀ bzw. M₁₃₃ im Zwischenmagen des Truthahns]), die das Enzym an die Myosinfilamente bindet, und einer 20 kDa Untereinheit (M20) unbekannter Funktion ein Holoenzym. Dieses Holoenzym ist die Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins, die MLCP (Hartshorne et al. 1998, Hartshorne und Hirano 1999). Für die Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur ist die PP1 von zentraler Bedeutung, da sie als MLCP zur Relaxation der Muskulatur beiträgt. Lange Zeit wurde angenommen, dass der Grad der Phosphorylierung der MLC₂₀ und damit die glattmuskuläre Kontraktion ausschließlich durch die Aktivität der MLCK beeinflusst wird. Dies basierte auf der Annahme, dass die MLCP gleichmäßig aktiv ist, jedoch sind inzwischen mehrere Mechanismen der Regulation der MLCP bekannt (Araki et al. 2001, Guo et al. 2003, Kitazawa et al. 2000, Niiro et al. 2003, Sward et al. 2000, 2003). Dazu gehören der Rho-kinase- und der DAG-Signaltransduktionsweg. Über den Rho-assoziierte-kinase (ROK) - Signaltransduktionsweg wird die MYPT1 durch Phosphorylierung gehemmt und über den DAG-Signaltransduktionsweg wird die MLCP über den Inhibitor CPI-17 gehemmt. Die über diese Signaltransduktionswege vermittelte Hemmung der MLCP führt zu einer Ca²⁺-unabhängigen Verschiebung des MLCP-MLCK-Verhältnisses zugunsten der MLCK und wird auch als Calciumsensitivierung bezeichnet (Somlyo und Somlyo 2000). CPI-17 ist ein hoch potenter Inhibitor der MLCP, der unter 1.4.1. näher beschrieben wird.

Das Holoenzym der PP2A besteht aus einer strukturellen Untereinheit (A), an welche eine katalytische Untereinheit (C) sowie eine regulatorische Untereinheit (B) binden können (s. Abb. 1.3.). Neben dieser trimeren Form existiert auch eine dimere Form aus A und C (Kremmer et al. 1997).

**Abb. 1.3.: Modell des PP2A-Holoenzym**

Das Holoenzym PP2A ist ein Trimer. Es besteht aus der strukturellen (**A**), einer regulatorischen (**B**) und der katalytischen (**C**) Untereinheit. Die A-Untereinheit ist ein längliches, gebogenes Molekül, an dessen hydrophoben Bereich die Untereinheiten B und C binden (nach Virshup 2000).

Die A-Untereinheit bildet die strukturelle Basis der PP2A, von der zwei bekannte Isoformen ($A\alpha$ und $A\beta$) existieren. Sie ist ein bogenförmig gefaltetes Protein, bestehend aus 15 sich wiederholenden Abschnitten mit je 39 Aminosäuren (Groves et al. 1999). Diese werden auch als HEAT-Wiederholungssequenzen bezeichnet. Die Bezeichnung HEAT leitet sich von den Proteinen ab, in denen diese auffallende Struktur bisher gefunden wurde, nämlich **H**untingtin, **E**longationsfaktor, **A**-Untereinheit der PP2A und **T**OR-Kinase (Virshup 2000). Die Wiederholungssequenzen besitzen hydrophobe Domänen (Groves et al. 1999, Ruediger et al. 1992, Ruediger et al. 1999), die auf der Innenseite des gebogenen Moleküls liegen. Über diese hydrophobe Oberfläche werden die Untereinheiten B und C gebunden.

Die B-Untereinheiten werden stark gewebespezifisch exprimiert. Sie besitzen eine Schlüsselrolle in der Regulation der PP2A. Sie bestimmen nicht nur die Aktivität und Substratspezifität, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation der PP2A (McCright et al. 1996b, Tehrani et al. 1996). Die Gruppe der B-Untereinheiten ist sehr heterogen. Die verschiedenen B-Untereinheiten werden in drei Gruppen eingeteilt (B, B' und B''), die in ihrer Proteinsequenz keine Gemeinsamkeiten aufweisen (Herzig und Neumann 2000, Mumby und Walter 1993). Die Gruppe B besteht aus $B\alpha$, $B\beta$ und $B\gamma$ mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa (Pallas et al. 1992, Zolnierowicz et al. 1994). Die Gruppe B' besteht aus zahlreichen Isoformen und Spleißvarianten mit einem Molekulargewicht von 54 bis 70 kDa (Csontos et al. 1996, McCright et al. 1996a, McCright und Virshup 1995, Tehrani et al. 1996). Zu dieser Gruppe gehört auch die in dieser Arbeit näher untersuchte Untereinheit $B56\alpha$. Die Untereinheiten der Gruppe B'' haben ein Molekulargewicht von 72 und 130 kDa, wobei es sich dabei um Spleißvarianten desselben Gens handelt (Hendrix et al. 1993a).

Die Gruppe der B-Untereinheiten besitzt zwei Domänen, welche die Bindung zur A-Untereinheit vermitteln. Bei B56 α liegen diese zwei Domänen zwischen den Aminosäuren 188 bis 292 und 329 bis 386 (Li und Virshup 2002).

Die katalytische Untereinheit (C) existiert, ebenso wie die A-Untereinheit, in zwei Isoformen (PP2A_{C α} und PP2A_{C β}), welche ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa besitzen (Green et al. 1987). Durch Interaktion mit den Untereinheiten A und B werden die subzelluläre Lokalisation, die Substratspezifität und die Aktivität der katalytischen Untereinheit reguliert (McCright et al. 1996b, Tehrani et al. 1996). Darüber hinaus kann die Aktivität der katalytischen Untereinheit direkt durch posttranslationale Modifikationen am C-terminalen Ende beeinflusst werden. Die Methylierung der Aminosäure Leuzin 309 des C-terminalen Endes durch eine spezifische Methyltransferase steigert die Aktivität der PP2A (Favre et al. 1994, Xie und Clarke 1994). Die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin 307 des C-terminalen Endes durch eine Protein-Tyrosin-Kinase hingegen hemmt die Aktivität der PP2A (Chen et al. 1992, Guo und Damuni 1993). Im Folgenden wird die Bezeichnung PP2A für die katalytische Untereinheit der PP2A verwendet.

PP1 und PP2A bilden etwa 90% der im Herzen vorhandenen Phosphataseaktivität (Ingebritsen et al. 1983, Lüss et al. 2000, MacDougall et al. 1991). Auch im glatten Muskel handelt es sich bei der Phosphatase der leichten Kette des Myosins je nach Gewebe um PP1 oder PP2A (Erdödi et al. 1996, Onishi et al. 1982, Shirazi et al. 1994, Sobieszek et al. 1996).

1.4. Hemmstoffe der PP1

1.4.1. Endogene inhibitorische Proteine

Die PP1 wird durch mehrere endogene inhibitorische Proteine reguliert, wozu der Inhibitor 1 (I₁), der Inhibitor 2 (I₂), das Dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein-32 (DARPP-32) und der nukleäre Inhibitor der PP1 (NIPP-1) gehören (Cohen 2002, Herzig und Neumann 2000). Der inhibitorische Effekt aller vier Inhibitoren ist thermo- und säurestabil. I₁ und DARPP-32 sind Strukturhomologe; zu I₂ oder NIPP-1 bestehen hingegen kaum Sequenzhomologien. Auch unterscheiden sich I₁ und I₂ in Bezug auf ihre Regulation durch Phosphorylierung. I₁ entwickelt seinen inhibitorischen Effekt erst nach Phosphorylierung durch die PKA (Endo et al. 1996, Huang et al. 1999). Gegensätzlich dazu verhält sich I₂. Die unphosphorylierte Form von I₂ hemmt die PP1 sehr potent, jedoch wird die Effektivität von I₂ durch Phosphorylierung vermindert. Inaktive Komplexe von PP1 mit I₂ werden durch Phosphorylierung der Inhibitoren reaktiviert (Beullens et al. 1999, Huang et al. 1999, Jagiello et al. 1995, Park und DePaoli-Roach 1994).

Interagiert der unphosphorylierte I_2 mit der PP1, kommt es zunächst zur Hemmung der Enzymaktivität und anschließend zur Bildung eines stabilen, inaktiven Komplexes, der als ATP-Mg-abhängige Phosphatase bezeichnet wird. Phosphorylierung des Heterodimers am Threonin-72 des I_2 durch Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) führt zu einer Erhöhung der Phosphataseaktivität ohne vorherige Dissoziation des Komplexes (DePaoli-Roach 1984). Es wird vermutet, dass durch die Phosphorylierung des I_2 eine Konformationsänderung ausgelöst wird, welche die katalytische Untereinheit in einen aktiven Zustand versetzt. Nach einer schnellen Autodephosphorylierung wird der Komplex gegenüber exogenem Substrat katalytisch aktiv. Im dephosphorylierten Komplex kehrt die katalytische Untereinheit anschließend wieder langsam zum ursprünglichen inaktiven Zustand zurück (s. Abb. 1.4., Park und DePaoli-Roach 1994). Damit zeigt der I_2 sowohl hemmende als auch inaktivierende Effekte (Bollen und Stalmans 1992). Die Hemmung erfolgt schnell und kann nicht durch Phosphorylierung aufgehoben werden. Unter hemmenden Bedingungen verbleibt die PP1 in der aktiven Konformation. Im Gegensatz dazu erfolgt die Inaktivierung langsamer und es kommt zu einer Konformationsänderung der PP1 in eine inaktive Form. Diese Konformationsänderung kann durch Phosphorylierung von I_2 , nicht aber durch Elimination des I_2 , aufgehoben werden.

In jüngerer Zeit wurde ein weiterer PP1-Inhibitor entdeckt, das sog. CPI-17 (PKC potenziertes inhibitorisches Protein der PP1, 17 kDa). CPI-17 wird ausschließlich in der glatten Muskulatur und im Gehirn exprimiert. CPI-17 entwickelt einen 1000 fach höheren inhibitorischen Effekt nach Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) oder Rho-assoziiierter Kinase (ROK) (Eto et al. 2004) und ist ein potenter Inhibitor der MLCP (Kitazawa et al. 2000, Li et al. 1998). CPI-17 verbindet sich mit PP1 und MYPT1 zu einem stabilen inaktiven Komplex. Im Gegensatz zu CPI-17 hemmt I_2 in vitro bis in mikromolare Konzentrationen nicht die MLCP. In weiteren in vitro-Experimenten wurde nachgewiesen, dass nur CPI-17 und nicht I_2 mit PP1-MYPT1-Komplexen, die aus Glattmuskellysaten stammten, assoziierte (Eto et al. 2004).

Die Existenz einer großen Anzahl endogener Inhibitoren der PP1 deutet darauf hin, dass es für eine funktionierende Zellhomöostase wichtig ist, die Aktivität einer ungebundenen und damit unregulierten PP1 unter eine adäquate Kontrolle zu stellen (Cohen 2002).

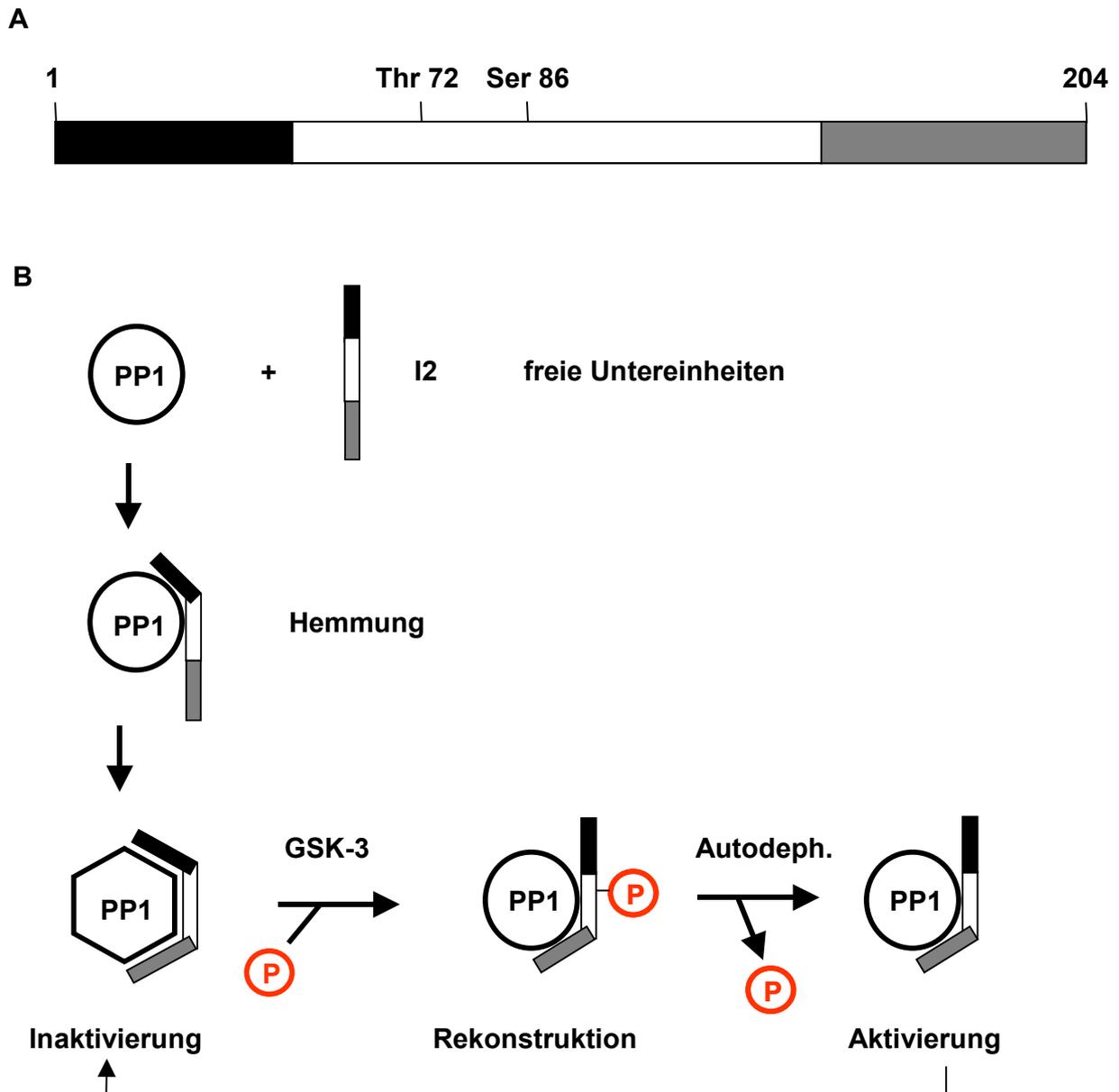


Abb. 1.4.: Schema zur Interaktion zwischen der Proteinphosphatase 1 (PP1) und dem Inhibitor 2 (I₂)

(A) Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Inhibitors 2 der Proteinphosphatase 1 (I₂). (B) Modell der Hemmung, Inaktivierung, Rekonstitution und Aktivierung der PP1 durch den I₂. GSK-3: Glykogen-Synthase-Kinase-3, P: Phosphat, Thr72: Threonin-72 des I₂ (verändert nach Park und DePaoli-Roach 1994).

1.4.2. Exogene Hemmstoffe

Die Untersuchung der PPs wurde durch die Entdeckung exogener Hemmstoffe erleichtert (Herzig und Neumann 2000). So kann der Phosphatasehemmstoff Okadasäure zur Charakterisierung der PPs eingesetzt werden.

Okadasäure (OA) ist ein komplexer Polyether, der aus pazifischen Schwämmen (z.B. *Halichondria okadaï*) isoliert wird (Tachibana et al. 1981). OA hemmt die PP1- und PP2A-Aktivität mit IC₅₀-Werten von 270 und 2 nM (Bialojan und Takai 1988).

1.5. Pathophysiologische Bedeutung von Proteinphosphatasen im kardiovaskulären System

Proteinphosphatasen könnten eine pathophysiologische Bedeutung für die Entwicklung einer Herzhypertrophie und einer Herzinsuffizienz besitzen. Bei humanen Herzproben mit bestehender terminaler Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte Aktivität der Proteinphosphatasen gefunden, verglichen mit entsprechenden Präparaten aus nicht-insuffizienten Herzen. Diese Erhöhung war das Ergebnis einer gesteigerten Expression der PP1 (Mishra 2002, Neumann et al. 1997). Dies kann zu der verminderten Effektivität positiv inotrop wirkender Substanzen beitragen, wie es bei terminal insuffizienten Herzen beobachtet wurde (Bristow et al. 1982). Der Grund dafür könnte die geringere Phospholamban-Phosphorylierung sein, welche bei diesen Herzen beobachtet wurde. Die geringere Phospholamban-Phosphorylierung hat eine verminderte SERCA-Aktivität zur Folge, so dass weniger Ca²⁺ in das SR gepumpt wird und somit weniger Ca²⁺ bei den folgenden Kontraktionen zur Verfügung steht. Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es bei Herzinsuffizienz und nach chronischer β-adrenerger Stimulation zu einer Erhöhung der Proteinphosphatase-Aktivität kommt (Boknik et al. 2000, Gupta et al. 2003). Dabei konnte eine verminderte Phospholamban-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Boknik et al. 2000). Die Veränderungen bei transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression der PP1 sind phänotypisch der menschlichen Herzinsuffizienz sehr ähnlich (Carr et al. 2002). Die kontraktile Antwort auf β-adrenerge Stimulation in Kardiomyozyten aus terminal insuffizienten Herzen konnte wiederhergestellt werden, indem die PP1 mittels Überexpression eines konstitutiv aktiven Inhibitors gehemmt wurde (Carr et al. 2002). Dies zeigt ebenfalls die Bedeutung der PP1 als möglichem Regulator der Herzkontraktion. Nicht nur eine gesteigerte Aktivität der PP1, sondern auch eine erhöhte Expression und Aktivität der PP2A kann die Herzfunktion negativ beeinflussen. So konnte in einem transgenen Mausmodell durch herzspezifische Überexpression der PP2A eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz induziert werden. Das absolute und relative Herzgewicht bei diesen transgenen Tieren war um 29% bzw. 23% erhöht und wurde von einer zellulären Hypertrophie begleitet. Es zeigten sich in den Herzen von 10 Wochen alten transgenen Mäusen Inseln von Nekrosen und Anzeichen einer beginnenden Fibrose, zudem wurde eine erniedrigte Zellverkürzung gefunden. Aufgrund der erhöhten PP2A-Aktivität war der Phosphorylierungsgrad der Proteine TnI und PLB erniedrigt. Die Expression

von PP1, Calsequestrin, SERCA und PLB war unverändert in diesen transgenen Herzen. Diese Untersuchung zeigt, dass nicht nur PP1, sondern auch PP2A bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielt. Jedoch wurde in Herzhomogenaten keine erhöhte Expression von regulatorischen Untereinheiten der PP2A wie A α und B56 α festgestellt (Gergs et al. 2004). Die Relevanz dieser beiden Untereinheiten für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz wurde bisher nicht geklärt.

Auch im glatten Muskel regulieren Phosphorylierungsreaktionen die Kontraktion. So konnten bei vaskulären Erkrankungen, wie Hypertonie und koronarer Herzerkrankung, kontraktile Störungen des glatten Muskels gefunden werden (Somlyo und Somlyo 1994). Die Phosphorylierung von MLC₂₀ bedingt den Beginn der Kraftentwicklung (Hartshorne et al. 1989, Somlyo und Somlyo 1992). Eine veränderte Phosphataseaktivität könnte demnach auch bei vaskulären Erkrankungen, wie Bluthochdruck, eine Rolle spielen (Knapp et al. 1999).

Inwiefern inhibitorische Proteine von Proteinphosphatasen die Pathogenese von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz beeinflussen können und somit eine klinische Relevanz erhalten, wurde bisher in transgenen Mäusen, welche die endogenen Inhibitoren I₁ oder I₂ überexprimieren untersucht. Beide transgenen Mauslinien zeigten erhöhte Ca²⁺-Transienten und daraus folgend eine verbesserte Zellverkürzung (Pathak et al. 2005). Jedoch wird bei der transgenen I₂-Maus ein um 64 Aminosäuren verkürztes bzw. trunkiertes Protein exprimiert, welches nicht durch Phosphorylierung reguliert werden kann (Kirchhefer et al. 2005).

2. Fragestellung

Durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung verschiedener regulatorischer Proteine (z.B. PLB, L-Typ Ca^{2+} -Kanal) kann die Ca^{2+} -Konzentration in der Herzmuskulatur verändert werden. 90% der regulatorischen Proteine in der Herzmuskelzelle werden von den Proteinphosphatasen Typ 1 (PP1) und 2A (PP2A) dephosphoryliert. Für die PP2A und ihre Untereinheiten ist die Bedeutung für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nicht geklärt.

Aufgrund der Bedeutung der PP2A für die Herzmuskelzelle stellt sich die Frage, ob PP2A und ihre Untereinheiten bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielen. Deshalb sollte die Expression von drei Untereinheiten der PP2A [katalytische ($\text{PP2A}_{\text{C}\alpha}$), strukturelle ($\text{PP2A}_{\text{A}\alpha}$) und regulatorische ($\text{PP2A}_{\text{B56}\alpha}$)] in explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht werden. Zusätzlich sollten transgene Mausmodelle, die $\text{PP2A}_{\text{A}\alpha}$ oder $\text{PP2A}_{\text{B56}\alpha}$ unter Kontrolle des herzspezifischen α -MHC-Promotors überexprimieren, generiert werden, um die mögliche Entwicklung einer Herzinsuffizienz und/oder Herzhypertrophie zu untersuchen. Dabei sollten proteinchemische Untersuchungen verschiedener regulatorischer Proteine wie z.B. Phospholamban (PLB), Troponin-Inhibitor (TnI) und $\text{PP2A}_{\text{C}\alpha}$, $\text{PP2A}_{\text{A}\alpha}$ und $\text{PP2A}_{\text{B56}\alpha}$, an den transgenen Mäusen erfolgen. Dies sollte klären, inwiefern eine Überexpression der $\text{PP2A}_{\text{A}\alpha}$ die Expression oder den Phosphorylierungsgrad verschiedener regulatorischer Proteine der Herzmuskelzelle beeinflusst. Danach sollten sich funktionelle Untersuchungen anschließen wie die Messung der Phosphataseaktivität, der Ca^{2+} -Transienten und der Hämodynamik, um die Bedeutung der $\text{PP2A}_{\text{A}\alpha}$ für die Aktivität der PP2A, die Herzkontraktion und den Kreislauf festzustellen.

Die PP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz und es wurden zwei inhibitorisch wirkende Proteine I_1 und I_2 untersucht. Die Wirkung des endogenen Inhibitors 2 (I_2) ist in einem transgenen Mausmodell untersucht worden, indem eine trunkierte Version des I_2 im Herzen überexprimiert wurde. Das trunkierte Protein besitzt eine nicht zu phosphorylierende Phosphorylierungsstelle an Threonin 72 (Kirchhefer et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein transgenes Mausmodell generiert werden, welches das endogene I_2 ohne Deletion von 64 Aminosäuren überexprimiert, und proteinchemisch und funktionell untersucht werden, um dieses transgene I_2 -Mausmodell mit dem vorhandenen transgenen trunkierten I_2 -Mausmodell zu vergleichen. Parallel dazu wurde I_2 mittels eines adenoviralen Expressionssystem in neonatalen und adulten Kardiomyozyten exprimiert, um die Auswirkungen von I_2 auf die Expression oder den Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine wie z.B. PLB und TnI auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Gleichzeitig soll auch die Expression von PP1 und PP2A untersucht werden. Die Daten der mit dem I_2 -Adenovirus

infizierten Kardiomyozyten sollen mit den Daten der transgenen I₂-Mausmodelle verglichen werden.

Im Gegensatz zum Herzmuskel wird im glatten Muskel der kontraktile Zustand durch den Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (MLC₂₀) bestimmt. Der Phosphorylierungsgrad der MLC₂₀ wird jedoch nicht allein durch die Ca²⁺-abhängige phosphorylierende Aktivität der Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) bestimmt, sondern zusätzlich durch die Ca²⁺-unabhängige dephosphorylierende Aktivität der Proteinphosphatase der leichten Kette des Myosins (MLCP). Somit kann auch über die Hemmung der MLCP die Kontraktionskraft gesteigert werden. Eine Erhöhung der Kontraktionskraft in den Widerstandsgefäßen könnte zu einer Erhöhung des Blutdruckes führen.

Um die Auswirkungen einer glattmuskelspezifischen Überexpression von I₂ in einem transgenen Mausmodell zu untersuchen, sollte eine transgene Maus generiert werden, die I₂ unter Kontrolle des SM-MHC-Promotors überexprimiert. Zusätzlich zu den proteinchemischen Untersuchungen sind die funktionellen Untersuchungen, wie Messung der Kontraktionskraft und des Blutdruckes von besonderem Interesse. Es wird vermutet, dass es über eine I₂-bedingte Hemmung der MLCP zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft kommt. Eine erhöhte Kontraktionskraft würde einen geringeren Gefäßdurchmesser in den Widerstandsgefäßen zur Folge haben und somit einen erhöhten Blutdruck. Parallel sollte I₂ im adenoviralen Expressionssystem in der A₇R₅-Zelllinie, die aus fetalen vaskulären glatten Muskelzellen isoliert wurde, und in primären vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert werden. Mit der A₇R₅-Zelllinie soll überprüft werden, ob das adenovirale Expressionssystem auf vaskuläre glatte Muskelzellen angewandt werden kann. Die primären vaskulären glatten Muskelzellen sind den glatten Muskelzellen in den Gefäßen funktionell sehr ähnlich, da sie aus der Aorta von adulten Ratten durch Aussprossung isoliert werden. Bei den I₂-exprimierenden primären vaskulären glatten Muskelzellen sollen, wie bei den transgenen Mäusen mit einer glattmuskelspezifischen Überexpression von I₂, proteinchemische und funktionelle Untersuchungen wie Messung der Kontraktionskraft durchgeführt werden und mit den Ergebnissen der transgenen Mauslinie verglichen werden.

Durch diese Untersuchungen und Modelle soll ein detaillierterer Einblick in die Regulationsmechanismen der Kontraktion der Herz- und Gefäßmuskulatur gewonnen werden. Als weiterer Aspekt sollten Optionen zu der Beeinflussung der zellulären PP-Aktivität untersucht werden, die als Basis neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dienen könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Gewebe

Herzgewebe und Koronararterien des Menschen

Das verwendete menschliche Probenmaterial (Herzgewebe, Koronararterien) stammte von Patienten, die sich aufgrund einer dilatativen (DCM) oder ischämischen Kardiomyopathie (ICM) einer Herztransplantation unterziehen mussten. Als Kontrolle dienten Spenderherzen, die keinerlei Anzeichen einer Herzinsuffizienz zeigten, jedoch nicht transplantiert werden konnten. Für die Untersuchungen bestand das Einverständnis seitens der Universitäts-Ethikkommission (Reg.Nr.: 0Xneum vom 19.10.2000). Die Patienten wurden vor dem Eingriff informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das Herz wurde direkt nach Entnahme aus dem Thorax in Tyrodelösung (s. 7.1.) überführt und in das Labor transportiert. Dort erfolgte die Feinpräparation. Es wurde Gewebe des linken Ventrikels entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zusätzlich wurde der Ramus interventricularis anterior sowie der Ramus circumflexus der linken Koronararterie präpariert. Koronararterien aus DCM-Herzen zeigten keinerlei pathologische Veränderungen. Diese wurden als Kontroll-Koronararterien verwendet, da keine Präparate aus gesunden Spenderherzen zur Verfügung standen. Koronararterien aus ICM-Herzen zeigten auffällige atherosklerotische Plaques. Die isolierten Koronararterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Herzgewebe der Maus

Die verwendeten Herzen stammten von erwachsenen Mäusen (Alter: 8-12 Wochen). Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt.

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch Einatmen von Kohlendioxid getötet. Der Thoraxraum wurde vollständig eröffnet, das Herz wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Zellen

3.1.2.1. Zellkultur

HEK₂₉₃-Zellen

Die HEK₂₉₃-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie, die aus embryonalen Nierenzellen gewonnen wurde. In HEK₂₉₃-Zellen wurde der Adenovirus Ad-I₂ amplifiziert. Zur Kultur von HEK₂₉₃-Zellen siehe 3.2.1..

A₇R₅-Zellen

Die A₇R₅-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende klonale Zelllinie, die aus embryonalen glatten Muskelzellen gewonnen wurde (Kimes und Brandt 1976). A₇R₅-Zellen dienen der Charakterisierung rekombinanter Adenoviren. Zur Kultur von A₇R₅-Zellen siehe 3.2.2..

3.1.2.2. Primäre Zelllinien

Neonatale Rattenkardiomyozyten

Rattenkardiomyozyten wurden aus neugeborenen (1-3 Tage) Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchon) isoliert und als Primärkultur im Zusammenhang mit dem adenoviralen Expressionssystem verwendet. Zur Isolierung und Kultur siehe 3.2.3..

Vaskuläre glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen wurden aus Rattenaorta von Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchon) durch Aussprossstechnik isoliert und als Primärkultur im Zusammenhang mit dem adenoviralen Expressionssystem verwendet. Zur Isolierung und Kultur siehe 3.2.4..

Adulte Rattenkardiomyozyten

Rattenkardiomyozyten wurden aus 200–250 g schweren Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchon) isoliert und als Primärkultur im Zusammenhang mit dem adenoviralen Expressionssystem verwendet. Zur Isolierung und Kultur siehe 3.2.5..

3.2. Zellkultur

3.2.1. Anzucht und Kultur von HEK₂₉₃-Zellen

Kryokonservierte HEK₂₉₃-Zellen (ATCC, Manassas, USA, in HEK-Medium mit 5-10% (V/V) DMSO) wurden aus der Stickstoffkühlung entnommen und durch schnelle Zugabe von einem Milliliter auf 37°C vorgewärmtem HEK-Medium (s. 7.1.) aufgetaut. Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit integrierten hydrophoben Filtern in der Schraubkappe ausgesät und mit weiterem HEK-Medium versorgt. Nach einer Kulturzeit von 24 h (bei 37°C, 5% CO₂) wurde das Medium einmal gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellpassage

erfolgte je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 bei ca. 95% Konfluenz. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Abspülen des Zellrasens mit Hilfe einer Meßpipette.

3.2.2. Anzucht und Kultur von A₇R₅-Zellen

Kryokonservierte A₇R₅-Zellen (in HEK₂₉₃-Medium mit 5% (V/V) DMSO) wurden analog dem Verfahren bei HEK₂₉₃-Zellen (s. 3.2.1.) aufgetaut. Die Zellen wurden mit Erreichen einer Konfluenz von 95% je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 aufgeteilt. Das alte Medium wurde vollständig entfernt und drei Milliliter vorgewärmte 1 x Trypsin/EDTA-Lösung (in PBS pH 7.45 aus 100 x Lösung, Gibco/Life Technologies) je 75cm² Zellrasen zugegeben. Die Zellen wurden für eine Minute unter Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert und anschließend wurde, um die optimale Einwirkzeit feststellen zu können, der weitere Verlauf der Trypsinisierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Spätestens fünf Minuten nach der Trypsinzugabe sollte sich die Mehrzahl der Zellen abgelöst haben und abgerundet in der Trypsinlösung schwimmen. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Medium inaktiviert, die Zellen mit einer Meßpipette suspendiert und erneut in Kulturschalen ausgesät.

3.2.3. Isolierung und Kultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit Hilfe eines kommerziellen Isolationssystem (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA) basierend auf der Methode nach Toraason et al. (1989) isoliert. Es wurden ca. 20 neonatale Ratten (1-3 Tage alt) mit einer Schere dekapitiert. Der Brustraum wurde eröffnet und das Herz entnommen. Das Herz wurde 5 x mit PBS pH 7.45 mit Antibiotika (s. 7.1.) und 1 x mit calcium- und magnesiumfreier Hanks balancierter Salzlösung (CMF HBSS) gespült. Anschließend wurden die Herzen in vier bis sechs Teile mit zwei sterilen Skalpellern zerkleinert. Das zerteilte Herzgewebe wurde in neun Millilitern CMF HBSS aufgenommen und nach Zugabe von einem Milliliter Trypsinlösung (500 µg/ml Trypsin in CMF HBSS) für 16-20 h bei 4°C verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Milliliter Trypsin-Inhibitor-Lösung (2000 µg/ml Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen in CMF HBSS) bei 37°C gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit fünf Millilitern Collagenaselösung (300 U/ml Collagenase in Leibovitz-L15-Medium) versetzt, 30-45 min bei 37°C inkubiert, zehnmal mit Hilfe einer 10ml-Pipette auf und ab pipettiert. Die Zellsuspension wurde über ein mit Leibovitz-Medium gespültes Zellsieb filtriert. Das Zellsieb wurde danach erneut mit fünf Millilitern Leibovitz-Medium gespült. Das gesamte Filtrat wurde zentrifugiert (50-100 x g, 10 min, RT) und das Zellsediment in ca. 20 ml DMEM (25% FCS) aufgenommen. Dabei hat sich herausgestellt, dass das Volumen des DMEM (25% FCS) entsprechend der präparierten Tiere gewählt werden sollte (20 Tiere → 20 ml DMEM (25% FCS)). Die Zellsuspension wurde auf eine mit 0.15% Kollagen-beschichtete 154 cm²-Petrischale ausgebracht und für 15 - 20 min bei 37°C ruhend belassen, damit sich die

Fibroblasten absetzen konnten. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zelldichte bestimmt. Die Zelldichte und Vitalität der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (0.4%ige Lösung, Life Technologies, Karlsruhe) bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 12.5×10^4 Zellen/cm² ausgesät, für die Immunhistologie auf Objektträgern mit einer Kammerstruktur (Chamber Slides) und für Western Blot Analysen auf sechser Multischalen. Die weitere Kultur erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.4. Isolation und Kultur vaskulärer glatter Muskelzellen

Glattmuskuläre Zellen wurden in Anlehnung an die durch Ebersole et al. (1993) und Salih et al. (1992) beschriebene „Ausprosstechnik“ gewonnen. Nach Entfernung des Endothels mit einem Skalpell wurden ca. vier mm² große Gefäßstücke der Aortenwand (Aorta abdominalis) präpariert und in Zellkulturflaschen überführt. Zur besseren Anhaftung auf der Kulturoberfläche wurde für 15 – 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend Muskelzellmedium (DMEM 86%, FCS 10%, L-Glutamin 584 µg/ml, Amphotericin B 4.3 µg/ml, Penicillin G 100 IU/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml) hinzugefügt.

Die Kultur erfolgte in einem Inkubator unter Raumluft mit 7.5% CO₂ (37°C). Nach sieben bis zehn Tagen konnten auswachsende Zellen beobachtet werden. Bei Ausbildung einer konfluenten Zellschicht wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, die Zellen mit 10 facher Trypsin 0.05% / EDTA 0.02% - Lösung von der Kulturoberfläche abgelöst und subkultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen der zweiten bis sechsten Passage verwendet. Die Identität der Zellen wurde sowohl lichtmikroskopisch als auch durch immunhistologische Identifizierung von α-Aktin bestätigt (s. Abb. 4.18.).

3.2.5. Isolation und Kultur von adulten Rattenkardiomyozyten

Die adulten Rattenkardiomyozyten wurde von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Schlüter, Institut für Physiologie in Gießen, nach den dort vorliegenden Protokollen isoliert und kultiviert (Piper et al. 1982, Ross et al. 2005).

3.2.6. Kryokonservierung von Zellen

Kultivierte Zellen wurden von der Oberfläche der Zellkulturflaschen mit 1 facher Trypsinlösung abgelöst und abzentrifugiert (50-100 x g, 10 min, RT). Das Trypsin wurde entfernt, indem das Zellsediment einmal mit dem entsprechenden Zellkulturmedium gewaschen wurde. Danach wurden die Zellen in sterilem Kryokonservierungsmedium (FCS + 5% DMSO) aufgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3. Adenovirale Expressionssysteme

In dieser Arbeit wurde ein I₂- und Kontrolladenovirus für Untersuchungen benutzt. Diese Adenoviren wurden von Herrn Felix Balzer (Dissertation Balzer 2004) hergestellt.

3.3.1. Amplifikation von Viren und Titerbestimmung

Infizierte Zellen wurden analog dem unter 3.3.2. beschriebenen Verfahren geerntet. Der Virus wurde in drei weiteren Infektionszyklen mit steigenden Zellzahlen amplifiziert. Ein Infektionszyklus dauerte ca. drei Tage. Der fünfte Infektionszyklus diente zur Generierung einer Virusstammlösung. Hierzu wurden in vierundzwanzig 154 cm²-Petrischalen HEK₂₉₃-Zellen einer Konfluenz von 75% mit je 20 µl des virushaltigen Überstandes des vierten Infektionszyklusses infiziert. Nach drei Tagen zeigten alle Zellen eine grüne Fluoreszenz. Die infizierten Zellen wurden mit PBS pH 7.45 gewaschen und in fünf Millilitern 100 mM HEPES pH 7.4 resuspendiert. Die Zellen wurden aufgebrochen, indem die Zellsuspension jeweils 3 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut wurden. Somit wurde der Virus freigesetzt und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand als Virusstammlösung bezeichnet. Die Virusstammlösung wurde zur Titerbestimmung verwendet und bei -80°C gelagert.

MOI-Test

Der sogenannte MOI-Test (nach Quantum Biotechnologies, AdEasy Vector System, Application Manual, Version 1.2, Montreal, Kanada) diente als schnelle und einfach durchführbare Methode zur vorläufigen Bestimmung von Virustitern. Der Test wurde vor allem zur Titerbestimmung während der Virusamplifikation genutzt, kann eine abschließende genauere Titerbestimmung (s. u.) jedoch nicht ersetzen. In sechser-Multischalen wurden je Kammer 10⁶ H₉C₂-Zellen (Kultur von H₉C₂ analog zu 3.2.2.) ausgesät und für zwölf Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in H₉C₂-Medium kultiviert. Das Medium wurde anschließend entfernt und durch 0.025 bis 0.5 µl Viruslösung in je 500 µl H₉C₂-Medium ersetzt. Nach einer Infektionszeit von eine Stunde wurden weitere 1.5 ml Medium zugefügt und die Zellen für 72 h im Brutschrank kultiviert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Zellen mitgeführt. Die niedrigste Virusmenge, welche noch einen zytopathischen Effekt (Ablösung des gesamten Zellrasens) erzeugte, entsprach einer MOI von 10-20. Die Negativkontrolle durfte keinen zytopathischen Effekte aufweisen. Durch die Kenntnis des Volumens an Viruslösung und die vorgegebene Zellzahl konnte die Konzentration der infektiösen Viruseinheiten je Volumeneinheit (IU/µl) abgeschätzt werden.

Titerbestimmung

HEK₂₉₃-Zellen wurden auf Mikrotiterplatten (96 Kammern) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70% infiziert. Zur Infektion wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-17} der Virusstammlösung mit HEK-Medium hergestellt und 100 μ l der jeweiligen Verdünnung in die Kammern gegeben. Pro Verdünnung wurden zehn Kammern infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität wurden je Verdünnung zwei Kammern nicht infiziert. Der Infektionsverlauf wurde täglich über zehn Tage hinweg ausgewertet. Dabei wurde die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen je Kammer und Virusverdünnung ermittelt. In der höchsten Verdünnung, in der noch GFP-Expression auftrat, wurde eine grün fluoreszierende Zelle gleich einer infektiösen Viruseinheit (IU = *infectious unit* (analog zur Bezeichnung: efu = *expression forming unit*)) gesetzt und der Virustiter als infektiöse Viruseinheiten je Volumeneinheit (IU/ μ l) dargestellt.

3.3.2. Infektion von HEK₂₉₃-Zellen

HEK₂₉₃-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% in HEK₂₉₃-Medium (s. 7.1.) mit 1×10^7 IU des I₂-Adenovirus (I₂-Virus) infiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach der Infektion. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und abzentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Aufarbeitung der Proben und die Untersuchungen auf Proteinebene werden unter 3.5.1.ff geschildert.

3.3.3. Infektion von A₇R₅-Zellen

A₇R₅-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% in HEK₂₉₃-Medium (s. 7.1.) mit 1×10^7 IU des I₂-Virus infiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach der Infektion. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und abzentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Aufarbeitung der Proben und die Untersuchungen auf Proteinebene werden unter 3.5.1.ff geschildert.

3.3.4. Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Jeweils 10^6 neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit 1×10^7 IU des I₂-Virus für 72 h in NRC-Medium infiziert. Die Ernte und Homogenisation der Zellen erfolgte wie unter 3.5.1. beschrieben. Untersuchungen zur Phosphataseaktivität siehe 3.6.1..

3.3.5. Infektion vaskulärer glatter Muskelzellen

Die vaskulären glatten Muskelzellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% in HEK₂₉₃-Medium (s. 7.1.) mit 1×10^7 IU des I₂-Virus infiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 72 h nach der Infektion. Die infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale

abgelöst und abzentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Die Aufarbeitung der Proben und die Untersuchungen auf Proteinebene werden unter 3.5.1.ff geschildert.

3.3.6. Kultur und Infektion adulter Rattenkardiomyozyten

Die adulten Rattenkardiomyozyten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schlüter in Gießen isoliert und kultiviert. Infiziert wurden die adulten Rattenkardiomyozyten mit zwei verschiedenen Virusmengen mit 2.5×10^7 IU und 5×10^7 IU. Als Kontrolle dienten adulte Rattenkardiomyozyten infiziert mit dem Kontrolladenovirus (Ktr-Virus). Die infizierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden nach 24 h und 48 h geerntet. Die Aufarbeitung der Proben und die Untersuchungen auf Proteinebene werden unter 3.5.1.ff geschildert.

3.4. Arbeitstechniken mit DNA

3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Chemokompetente Zellen

Zur Transformation von Plasmiden wurden *E. coli* für die Aufnahme von DNA "kompetent" gemacht. Es wurden die *E. coli*-Stämme XL1 Blue, JM 109 oder Top10F verwendet. Von einer Gefrierkultur wurde zuerst in 8 ml LB-Medium eine Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 500 ml LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft und das Wachstum bei 37°C durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm überprüft. Nach Erreichen einer OD_{595} von 0.5 (nach 3 – 4 h) wurde die Kultur für 10 min (2 000 x g, 4°C) zentrifugiert (Centrikon Typ T-124). Das Bakteriensediment wurde mit 150 ml eiskalter Lösung RF-1 (s. 7.1.) resuspendiert, 15 min auf Eis gestellt und anschließend die Zellen wieder abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter Lösung RF-2 (s. 7.1.) aufgenommen und in Teilen von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Elektrokompetente Zellen

Elektrokompetente Zellen wurden nach der Methode von Dower et al. (1988) hergestellt. Es wurden die *E. coli*-Stämme BJ5183 und DH10B verwendet. Fünf Milliliter LB-Medium ohne Antibiotikazusatz wurden mit 40 µl *E. coli*-Glycerinkultur angeimpft und im Schüttelinkubator über Nacht angezogen (37°C, 180 rpm). Mit der Vorkultur wurde ein Liter LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die OD_{578} 0.6-0.8 betrug. Die Kultur wurde für eine Stunde auf Eis gestellt und anschließend bei 1 400 x g für zehn Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in 100 ml kaltem Waschpuffer (s. 7.1.) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 ml Waschpuffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. 19 ml Waschpuffer wurden abgenommen und die

Zellen in dem verbliebenen Waschpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Teilen von 40 µl in flüssigem Stickstoff gefroren bzw. direkt verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.4.2. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Hitzeschock

100 µl der kompetenten Bakterien wurden mit 5-10 ng Plasmid-DNA bzw. 2-5 µl eines Ligationsansatzes durch Hitzeschock transformiert (Sambrook et al. 1989). Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum enthielten (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin oder 10 µg/ml Tetracyclin). Die LB-Agarplatten wurden auf dem Kopf stehend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Bis zu 1.0 µg salzfreie DNA wurden mit 40 µl der nach 3.4.1. erhaltenen elektrokompetenten *E. coli* gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Gene Pulser®-Küvette, Biorad). Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer (Gene Pulser®, Biorad) bei 2500 V, 200 Ohm und 25 µF. Zu dem elektroporierten Ansatz wurden sofort 500 µl SOC-Medium (s. 7.1.) gegeben. Es war entscheidend, die elektroporierten und damit geschädigten Zellen schnell mit Medium zu versorgen, da die Überlebensrate in den ersten Minuten nach der Elektroporation ohne Substratzusatz stark abnimmt. Aus diesem Grund wurde auch das „reichere“ SOC-Medium verwendet. Die Zellen wurden aus den Küvetten in 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C für 60 min geschüttelt (Thermomixer). Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die das Antibiotikum des Resistenzgens enthielten. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert (Dower et al. 1988).

3.4.3 Analytische Plasmidisolierung

Aus Bakterienkulturen von zwei bis fünf ml Volumen wurden die Plasmide durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim et al. 1979). Die abzentrifugierten Bakterienzellen wurden mit 500 µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer, s. 7.1.) gewaschen. Der Zellrückstand wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 (Lysispuffer, s. 7.1.) vollständig lysiert. Durch diese alkalische Lyse in Anwesenheit von SDS wurden Bakterienproteine zerstört und chromosomale Bakterien-DNA denaturiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P3 (Neutralisationspuffer, s. 7.1.) wurde die Lösung neutralisiert. Dies führt zu einer raschen Hybridisierung der Plasmid-DNA, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Vorhandenes SDS fällt als unlösliches Kalium-SDS in Form eines weißen, flockigen Niederschlags aus. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde der weiße Niederschlag durch Zentrifugation (15 800 x g, 4°C, 15 min) abgetrennt.

Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit 0.7 Volumenteilen 100%igem Isopropanol ausgefällt und 30 min niederzentrifugiert (13 600 x g, 4°C). Das DNA-Sediment wurde mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und unter Vakuum (SpeedVac® Plus AR) bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in sterilem, bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der DNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD_{260}/OD_{280} gebildet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen (Sambrook et al. 1989).

3.4.5 Klonierungstechniken

3.4.5.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach Angaben der Enzym-Hersteller durchgeführt.

3.4.5.2. Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden

Um die Religation eines Vektors mit kompatiblen Enden (z.B. nach Verdau mit nur einem Enzym) zu verhindern, wurde die geschnittene DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt. Die CIP spaltet die nach einem Restriktionsverdau verbleibenden Phosphatreste am 5'-Ende der DNA ab. Eine Ligation der Enden ist somit nicht mehr möglich. Das einzubauende Fragment besitzt diese Phosphatreste noch. Es ist also eine Ligation zwischen Vektor und Fragment, nicht aber zwischen den Vektorenden möglich. Zur Dephosphorylierung der 5'-Vektorenden wurde der Restriktionsansatz 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgte mit 1 U CIP (Roche, Mannheim) pro 7.5 µg DNA in 1x CIP-Puffer (Roche, Mannheim) für 30 min bei 37°C. Die CIP wurde für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

3.4.5.3 Glätten von 3'- bzw. 5'-DNA-Überhängen

Wurden für die Klonierung glatte DNA-Enden benötigt und bei der Restriktion mit Restriktionsendonucleasen 3'- bzw. 5'-DNA-Überhänge erzeugt, so wurden die Überhänge durch den Einsatz von Klenow-Fragment (das große Fragment der DNA Polymerase I von *E. coli*) „geglättet“. Bei 5'-Überhängen wirkt das Klenow-Fragment als Polymerase und lagert den fehlenden komplementären DNA-Strang an. Bei 3'-Überhängen wirkt das Klenow-Fragment als 3'-5'-Exonuclease. Der Reaktionsansatz enthielt neben der DNA noch zwei

Einheiten Klenow-Fragment (Roche, Mannheim) und 20 mM dNTP-Mix in 1 x Puffer für Taq-Polymerasen. Der Ansatz wurde 20 min bei 30°C inkubiert und anschließend die Polymerase bei 75°C (10 min) inaktiviert.

3.4.5.4 Agarosegelelektrophorese

Mittels der nativen Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe getrennt werden. Die Agarosekonzentration, die üblicherweise zwischen 0.5 und 2.0% liegt, bestimmt dabei den Trennbereich, so dass lineare DNA-Fragmente von 20 bis 0.1 kb getrennt werden können. Je nach gewünschtem Trennbereich wurde die entsprechende Menge Agarose in 50 ml TAE-Puffer (s. 7.1.) aufgekocht. Um die DNA später durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar zu machen, wurde 0.5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Proben wurden in einem 1x Probenpuffer (s. 7.1.) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 4 mA/cm.

3.4.5.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

„Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden)

Die DNA-Fragmente wurden im 1%igem Agarosegel (s. 3.4.5.4.) aufgetrennt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Zur Gelextraktion der DNA wurde der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet und die Aufarbeitung gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur Isolation der DNA aus Agarosegelen wird ein Silica-Material verwendet. Silica-Material bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und kann, nach einem Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden (Vogelstein 1979). Der DNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Invitrogen Gel Extraktionskit (Glasmilch)

Die DNA-Fragmente wurden im 1%igem Agarosegel (s. 3.4.5.4.) aufgetrennt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten. Zur Gelextraktion der DNA wurde der „Invisorb DNA Extraction Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und die Aufarbeitung gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur Isolation der DNA aus Agarosegelen wird Glasmilch verwendet. Diese Glasmilch bindet DNA bei hohen Salzkonzentrationen. Die DNA kann, nach zwei Waschschriffen mit einem Salz-Ethanol-Puffer, mittels eines salzfreien Puffer oder Wasser bei einer Temperatur von 60°C wieder abgelöst werden. Der DNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.4.5.6. Ligation

Die Ligation erfolgte mit zehn Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, Heidelberg oder Roche, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor und einzubauendem DNA-Fragment betrug in der Regel 1:5. Häufig wurden mehrere Ansätze mit verschiedenen Mengenverhältnissen parallel getestet. Weitere Bestandteile des Ligationsansatzes waren zwei Mikroliter 10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas, Heidelberg oder Roche, Mannheim) und ein Mikroliter ATP 20 mM. ATP war zwar bereits im Ligationspuffer vorhanden (1 mM), jedoch wurde zusätzliches ATP zugegeben (in der Literatur wird 1-5 mM empfohlen). Bei der Ligation von glatten DNA-Enden wurde zusätzlich PEG 4000 15% (m/V) zugesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

3.4.5.7. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz). Geeignete Sequenzierungsprimer wurden mit Hilfe des Programms OMIGA (Oxford Molecular, Oxford, England) ermittelt. Die Sequenzen der Primer sind unter 7.4. aufgelistet.

3.4.6. Amplifikation der strukturellen Untereinheit $A\alpha$ der PP2A mittels PCR

Die kodierende Sequenz der strukturellen Untereinheit $A\alpha$ der PP2A ($A\alpha$) wurde aus einem Plasmid pCR2.1::PP2A $A\alpha$ mittels PCR amplifiziert. Die kodierende Sequenz der strukturellen Untereinheit $A\alpha$ der PP2A ($A\alpha$) stammte aus cDNA von menschlichen Herzproben. Die verwendeten Primer sind in Tab. 7.4. aufgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt 1.6 mM dNTP-Mix (0.4 mM/Nukleotid), 0.6 μ M Forward-Primer, 0.6 μ M Reverse-Primer, 2 μ g cDNA, 2.5 u PWO-Polymerase und 2.5 mM MgSO₄ in 50 μ l 1x PCR-Puffer (Roche). Die PCR wurde mit dem in Tab. 7.4. beschriebenen Programm durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt und die entsprechende Bande (1898 bp) aus dem Gel extrahiert.

3.4.7. Generierung transgener Mäuse mit einer herzmuskelspezifischen Überexpression des I_2 unter Kontrolle des α -MHC-Promotors

Die Generierung von Mäusen mit einer herzmuskelspezifischen Überexpression des I_2 erfordert einen murinen Promotor, der die Transkription gewebespezifisch reguliert. Zu diesem Zweck wurde das Promotorfragment des α -MHC-Gens (bp 3060 bis 8501, Gulick et al. 1991) für die herzmuskelspezifische Überexpression verwendet.

3.4.7.1. Generierung transgener Mäuse

Klonierung der Expressionskassette

Die codierende Sequenz des Inhibitors 2 (I_2) wurde, wie unter 3.8.1. beschrieben, isoliert und „geglättet“ (s. 3.4.5.3.).

Die herzspezifische α -MHC-Promotorsequenz befindet sich in dem α -MHC-Vektor. Dieser wurde mit der Restriktionsendonuclease *Kpn I* verdaut. Für die Ligation mit dem I_2 mußten die entstandenen überhängenden Enden der α -MHC-Vektors erst geglättet werden (s. 3.4.5.3.).

Vorbereitung der Expressionskassette für die Mikroinjektion

Das α -MHC- I_2 -Plasmid wurde in einer 0.5 l-Kultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' amplifiziert und in einer präparativen Plasmidisolierung (s. 3.4.3.) isoliert. Durch Spaltung des α -MHC- I_2 -Plasmids mit dem Enzym *Nru I* wurden die prokaryontischen Sequenzen entfernt und die Expressionskassette bestehend aus α -MHC- I_2 (6800 bp) für die spätere Integration in das Maus-Genom linearisiert. Die DNA wurde über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle

Durch Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle der Maus wurde ein Gentransfer in die Keimbahn mit zufälliger Integration der DNA in das Genom erzeugt. Dazu wurden weibliche Mäuse mit Hormonen zur Superovulation stimuliert und verpaart. Die fertilisierten Eizellen wurden entnommen und die Fremd-DNA mit einer Glaskapillare in den männlichen Vorkern der Eizellen injiziert. Zellen, welche die Injektion überlebten, wurden in scheinchwangere weibliche Mäuse implantiert und von ihnen ausgetragen. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Dr. B. Skryabin vom Institut für Experimentelle Pathologie durchgeführt.

3.4.7.2. Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik (α -MHC- I_2 full length)

Der Nachweis des Transgens erfolgte wie unter 3.4.11. beschrieben aus genomischer DNA, die aus der Schwanzspitze der Maus isoliert (s. 3.4.10.) wurde. Das amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Länge von 410 bp.

3.4.8. Generierung transgener Mäuse mit einer herzmuskelspezifischen Überexpression der PP2A_{A α} unter Kontrolle des α -MHC-Promotors

Die Generierung von Mäusen mit einer herzmuskelspezifischen Überexpression der strukturellen Untereinheit A α der PP2A (PP2A_{A α}) erfolgte analog zur I_2 -Überexpressionsmaus.

Generierung transgener Mäuse

Die codierende Sequenz der PP2A_{Aα} wurde aus einem Klonierungszwischenprodukt dem pCR2.1-PP2A_{Aα} mittels PCR (s. 3.4.6.) amplifiziert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *Kpn* I isoliert.

Der Vektor, der die herzspezifische α-MHC-Promotorsequenz enthielt, wurde mit der Restriktionsendonuclease *Kpn* I geschnitten und mit der PP2A_{Aα}-Sequenz ligiert.

Vorbereitung der Expressionskassette für die Mikroinjektion

Das α-MHC-PP2A_{Aα}-Plasmid wurde in einer 0.5 l-Kultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' amplifiziert und in einer präparativen Plasmidisolierung (s. 3.4.3.) isoliert. Durch Spaltung des α-MHC-PP2A_{Aα}-Plasmid mit dem Enzym *Nru* I wurden die prokaryontischen Sequenzen entfernt und die Expressionskassette bestehend aus α-MHC-PP2A_{Aα} (8000 bp) für die spätere Integration in das Maus-Genom linearisiert. Die DNA wurde über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle

Das Verfahren der Mikroinjektion wurde unter 3.4.7.1. beschrieben.

3.4.9. Generierung transgener Mäuse mit einer glattemuskelspezifischen Überexpression des I₂ unter Kontrolle des SM-MHC-Promotors

Die Generierung von Mäusen mit einer glattemuskelspezifischen Überexpression des I₂ erfordert einen murinen Promotor, der die Transkription gewebespezifisch reguliert. Zu diesem Zweck wurde das Promotorfragment des SM-MHC-Gens für die glattemuskelspezifische Überexpression verwendet (Kotlikoff et al. 2002, Regan et al. 2000).

3.4.9.1. Generierung transgener Mäuse

Klonierung der Expressionskassette

Die codierende Sequenz des I₂ (Kitamura et al. 1991) wurde aus einem Klonierungszwischenprodukt, dem pAd-Track-I₂, durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Not* I isoliert, die Schnittstellen mit Hilfe von Klenow-Fragment „geglättet“ (s. 3.4.5.3.). Der Vektor, der die glattemuskelspezifische SM-MHC-Promotorsequenz (Kaninchen, 2.3 kb lang) enthielt, wurde mit der Restriktionsendonuclease *Xba* I geschnitten, die Schnittstelle mit Hilfe von Klenow-Fragment „geglättet“ (s. 3.4.5.3.) und der Vektor mit der I₂-Sequenz ligiert. Die Sequenz der Kassette wurde durch Sequenzierung überprüft.

Vorbereitung der Expressionskassette für die Mikroinjektion

Das SM-MHC-I₂-Plasmid wurde in einer 0.5 l-Kultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' amplifiziert und in einer präparativen Plasmidisolierung (s. 3.4.3.) isoliert. Durch Spaltung des pSM-MHC-I₂-Plasmids mit *Sph* I und *Sca* I wurden die prokaryontischen Sequenzen entfernt und die Expressionskassette bestehend aus SMHC -I₂ (3100 bp) für die spätere Integration in das Genom linearisiert. Die DNA wurde über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle

Das Verfahren der Mikroinjektion wurde unter 3.4.7.1. beschrieben.

3.4.9.2 Genotypisierung mit Hilfe der PCR-Technik

Der Nachweis des Transgens erfolgte wie unter 3.4.11. beschrieben aus genomischer DNA, die aus der Schwanzspitze der Maus isoliert wurde. Das amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Länge von 850 bp.

3.4.10. Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus

Mit einem sterilen Skalpell wurde eine Schwanzbiopsie der Maus genommen. Die Probe wurde mit 700 µl TE/SDS-Puffer (s. 7.1.) und 40 µl Proteinase K-Lösung versetzt und für ca. zwölf Stunden bei 55°C schüttelnd (1300 rpm, Thermomixer Modell 5436, Eppendorf AG, Hamburg) lysiert. Um die genomische DNA von Lipiden und Proteinen zu reinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Die Lösung wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, V/V/V) ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert (15 800 x g, 3 min, RT) und die obere, wäßrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Verunreinigungen wurden durch dieses Verfahren denaturiert und sammelten sich in der organischen Phase oder in der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verblieben. Um Phenolreste zu beseitigen, wurde die genomische DNA durch Zusatz von 70 µl Natriumacetat (3.0 M, pH 6.0) und 800 µl Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 800 x g, 20 min, RT). Das Sediment wurde, um Salzreste zu entfernen, einmal mit Ethanol 70% (V/V) gewaschen und bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß langsam getrocknet. Die DNA wurde in 80 µl sterilem, bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei 50°C für zehn Minuten gelöst.

3.4.11. Nachweis des Transgens mittels PCR

Der Nachweis, ob ein Transgen in das Genom einer Maus integriert wurde, erfolgte aus genomischer DNA, die aus der Schwanzspitze der Maus isoliert wurde (s. 3.4.10.). Es

wurden 1 µl der genomischen DNA in der PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM dNTP-Mix (2.5 mM/Nucleotid), 30 pmol des jeweiligen spezifischen vorwärts-Primers, 30 pmol des jeweiligen spezifischen rückwärts-Primers, 1.25 mM MgCl₂ und 1.66 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen[®], Karlsruhe) in 50 µl 1x PCR-Puffer. Die PCR wurde in einem PCR-Gerät (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer[®]) durchgeführt. Die Primersequenzen und die PCR-Programme sowie die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente sind in Tab. 7.4. aufgeführt.

3.5. Proteinchemische Arbeitstechniken

3.5.1. Herstellung von Homogenaten

Herzgewebe und Koronararterien des Menschen

Pulverisiertes, gefrorenes, myokardiales Gewebe des Menschen wurde unter ständiger Kühlung auf Eis in Homogenisationspuffer A (s. 7.1.) mit einem Polytron PT-MR 3000 dreimal für 30 sec homogenisiert und 20 min auf Eis inkubiert. Gefrorene Koronararterien des Menschen wurden in vorgekühlten Teflon-Gefäßen in einer Labor-Schwingmühle (Mikro-Dismembrator, B. Braun Biotech International AG, Melsungen) für eine Minute bei einer Schüttelfrequenz von 1800 rpm in Homogenisationspuffer A zerkleinert. Nach Inkubation auf Eis für 20 min wurden diese Proben anschließend dreimal für 10 sec mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®] 60, Virtis, New York, USA) homogenisiert. Alle Proben wurden für 15 min (15 800 x g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand als Homogenat bezeichnet.

Herzgewebe der Maus mit SDS

Pulverisiertes, myokardiales Gewebe der Maus wurde mit SDS/NaHCO₃ 1:1 (s. 7.1.) versetzt. Die Proben wurden dreimal 10 sec mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®] 60, Virtis, New York, USA) homogenisiert und für 20 min bei 25°C inkubiert. Grobe Gewebeteile wurden anschließend abzentrifugiert 15 800 x g (20 min) und der Überstand als Homogenat bezeichnet. Diese Homogenate wurden zum immunologischen Nachweis von verschiedenen Proteinen der Herzmuskelzelle verwendet.

Adenoviral infizierte Zellen (A₇R₅-Zellen, Neonatale Rattenkardiomyozyten)

Adenoviral infizierte Zellen wurden im Nährmedium mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und zentrifugiert (51 x g, 4 min, RT). Das Zellsediment wurde in sterilem, kaltem PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen und in SDS/NaHCO₃ 1:1 (s. 7.1.) aufgenommen. Um anhaftende Adenoviren zu inaktivieren, wurden die Proben für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®] 60,

Virtis, New York, USA) bei 3-5 W Leistung unter Kühlung homogenisiert und anschließend für zehn Minuten bei 15 800 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet.

3.5.2. Proteinbestimmungen

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Proben, die kein SDS enthielten, wurde mit dem Biorad Protein Assay Reagenz (Biorad Laboratories, München) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Bradford 1976). Als Proteinstandard wurde Albumin aus Rinderserum (Sigma-Aldrich®) verwendet.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in SDS-haltigen Proben nach Lowry et al. (1951). Als Proteinstandard wurde Albumin aus Rinderserum (Sigma-Aldrich®) verwendet.

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

Die Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970) in Gegenwart von SDS. Jede Proteinprobe wurde mit Probenpuffer (s. 7.1.) auf eine SDS-Konzentration von 5% (m/V) eingestellt und für 15 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt (Lindemann und Watanabe 1985). Benutzt wurde ein 4% (m/V) Polyacrylamid enthaltendes Sammelgel (nach Laemmli 1970) und ein 10% (m/V) Polyacrylamid enthaltendes Trenngel (nach Porzio und Pearson 1977). Die genaue Zusammensetzung der Gele ist im Anhang (s. 7.1.) beschrieben. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer vertikalen Hoefer SE600 Elektrophoresekammer in vorgekühltem Elektrodenpuffer (s. 7.1.) bei 4°C stromkonstant mit 40 mA pro Gel, bis die Farbfront des Probenpuffers den Übergang Sammelgel/Trenngel überschritt, und mit 60 mA pro Gel, bis die Farbfront den unteren Gelrand erreichte. Auf jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard (Amersham Biosciences, Freiburg, zur Zusammensetzung s. 7.1.) mitgeführt.

3.5.4. Western Blot-Verfahren

Die gelelektrophoretisch getrennten Proteine wurden im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (0.45 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen (Gershoni 1988, Towbin et al. 1979). Der Transfer wurde in einer Blotkammer (Hoefer, San Franc., USA) stromkonstant mit 1.5 A für drei Stunden bei 4°C in Transferpuffer (s. 7.1.) durchgeführt. Durch eine Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung (s. 7.1.) wurde der Erfolg des Transfers kontrolliert. Die Membran wurde getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken bei 4°C gelagert.

3.5.5. Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die Ponceau-S-gefärbten Membranen wurden entsprechend des zu erwartenden Molekulargewichts der zu identifizierenden Proteine (PP1_α 37 kDa, PP2A_{Cα} 37 kDa, PP2A_{Aα} 65 kDa, PP2A_{B56α} 56 kDa, I₂ 31 kDa) in Streifen geschnitten und in Puffer C (s. 7.1.) vollständig entfärbt. Zur Blockade unspezifischer Antikörperbindung wurden die Streifen 1 h mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung (in Puffer C, s. 7.1.) inkubiert. Die Streifen wurden 2 h mit dem ersten Antikörper inkubiert. Bei anschließender nicht-radioaktiver Detektion und bei radioaktiver Detektion wurden die Streifen mit den Puffern A und C (in der Reihenfolge A, C, C, A, je 5 min) gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper (2 Stunden) wurden die Streifen bei nicht-radioaktiver Detektion dreimal mit TBS, pH 9.4 (s. 7.1.) sowie einmal mit AP-Puffer (s. 7.1.) gewaschen, bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (in der Reihenfolge A, C, C, A, je 5 min). Die Antikörper wurden in der in Tab. 7.2. angegebenen Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung oder Autoradiographie.

3.5.6. Immunfärbung

Die Immunfärbung wurde zunächst mit dem Fluoreszenzsubstrat ECFTM (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Das ECFTM-Substrat wurde im Verhältnis 1:10 in AP-Puffer verdünnt und die Streifen 2 min damit inkubiert. Die alkalische Phosphatase des zweiten Antikörpers katalysiert die Dephosphorylierung des ECF-Substrats in ein Produkt, das bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert (maximale Anregung bei 430 nm). Die Fluoreszenz wurde mit einem PhosphorImager (STORM 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) detektiert und mit Hilfe der ImageQuant[®]-Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) ausgewertet. Nach der Detektion mit ECFTM wurden die Membranstreifen mit bidestilliertem Wasser entfärbt und für 10 min in AP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranstreifen durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-Toluidin-Salz (BCIP, 1.7%) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT, 3.3%) in AP-Puffer mit 1% Dimethylformamid detektiert.

3.5.7. Autoradiographie

Die Membranstreifen wurden für 2 h mit dem radioaktiv markierten Protein A (¹²⁵I-Protein A, 1:1000 in 5% Milchpulver-Lösung) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend je zweimal in Puffer A und Puffer C gewaschen. Die Membranen wurden für 30 min getrocknet, auf Trockenpapier fixiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in PhosphorImager[®]-Kassetten (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) exponiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 7.2. angegeben.

3.5.8. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch Densitometrie mit der ImageQuant[®]-Software. Das unspezifische Hintergrundsignal wurde von jedem Signal subtrahiert.

3.5.9. Immunhistologische Untersuchungen

Immunhistologische Untersuchungen von Mäuseherzen

Die Herzen von transgenen Mäuse wurden, wie unter 3.1.1. beschrieben entnommen und in Formalin fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Paraffin wurden 5 µm dicke, longitudinale Gewebeschnitte durch die linke Ventrikelwand angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger gebettet, getrocknet, deparaffinisiert und rehydriert. Anschließend wurde das Gewebe mit Zitronensäure behandelt (pH 6.0) und bei 120°C für 10 min erhitzt und mit Tris/HCl-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit BSA-c basic blocking solution (1:10 in PBS, Aurion, Wageningen, Niederlande) 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Nun wurden die Herzschnitte über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1-144 des humanen I₂ gerichtet ist (Transduction Laboratories, Lesington, USA), inkubiert. Nachdem die Herzschnitte mit PBS gewaschen wurden, wurde ein biotinyliertes Anti-Maus Immunoglobulin (DAKO, Carpinteria, USA) 2 h mit den Herzschnitten inkubiert. Wiederum wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Das, an den monoklonalen I₂-Antikörper gebundene, biotinylierte Anti-Maus Immunoglobulin kann mit den folgenden Substanzen sichtbar gemacht werden: Streptavidin-Cy3 (rote Farbe, Dianova, Hamburg) oder Streptavidin-Alexa-488 (grüne Farbe). Beides sind Fluoreszenzfarbstoffe, die bei UV-Anregung ihre jeweilige Farbe zeigen. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch Inkubation mit DAPI (5 µg/ml PBS, Sigma, Steinheim) für 15 sec. Für die abschließende Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Zeiss Axioskop mit geeignetem Filter verwendet.

Immunhistologische Untersuchungen von adenoviral infizierten Zellen (A₇R₅-Zellen, vaskuläre glatte Muskelzellen und neonatale Kardiomyozyten)

Die kultivierten Zellen wurden in „Chamber Slides“ (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) ausgesät und mit I₂-Adenoviren für 72 h und 1 x 10⁷ IU/cm² infiziert. Nach 72 h wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (pH 7.45) gewaschen. Zur Fixierung wurde 4% Formalin auf die Zellen gegeben und mindestens 1 h aber höchstens 24 h einwirken gelassen. Dann wurde das Formalin entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann Methanol dazugegeben, das 5 min einwirken musste. Nach Entfernung des Methanols sollten die Zellen schnell und nicht weniger als 1 h trocknen. Anschließend wurden die Zellen mit 0.1 ml Nonidet P-40 (Boehringer, Mannheim) behandelt. Nachdem

unspezifische Bindungen mit BSA-c basic blocking Lösung geblockt wurden, wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper, der gegen Aminosäuren 1-144 des humanen I₂ gerichtet ist (Transduction Laboratories, Lesington, USA) inkubiert. Dieser erste Antikörper wurde an biotinyliertes Anti-Maus Immunoglobulin (DAKO, Carpinteria, USA) gebunden und mit den folgenden Substanzen sichtbar gemacht: Streptavidin-Cy3 (rote Farbe, Dianova, Hamburg) oder Streptavidin-Alexa-488 (grüne Farbe, Dianova, Hamburg). Beides sind Fluoreszenzfarbstoffe, die bei UV-Anregung ihre jeweilige Farbe zeigen. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch Inkubation mit DAPI (5 µg/ml PBS, Sigma, Steinheim) für 15 sec. Für die abschließende Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Vision, Jena) mit geeignetem Filter verwendet.

3.6. Bestimmung der Phosphataseaktivität

3.6.1. Herstellung der Homogenate zur Messung der Phosphataseaktivität

Adenoviral infizierte Zellen

Adenoviral infizierte neonatale Kardiomyozyten (s. 3.3.4.) wurden zweimal mit sterilen, kalten PBS pH 7.45 (s. 7.1.) gewaschen, um anhaftende Viruspartikel zu entfernen und danach mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und in Homogenisationspuffer II (1 ml je 75 cm² Zellrasen) aufgenommen, dreimal für zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®] 60, Virtis, New York, USA) bei 3-5 W Leistung unter einer Sicherheitswerkbank auf Eis homogenisiert und anschließend 20 min bei 15 800 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet und bei -80°C gelagert. Der Probenansatz bestand aus 1.0 µg Gesamtprotein des Homogenats in zehn Mikrolitern Homogenisationspuffer II. Die Proben wurden entweder mit zwanzig Mikrolitern 1%igem DMSO oder 50 nM Okadasäure in 1%igem DMSO gemischt, für 10 min bei 30°C vorinkubiert und in den Phosphorylase a-Ansatz eingesetzt. Die Endkonzentration im Ansatz betrug 10 nM Okadasäure und diente der Unterscheidung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität.

Herzgewebe von Mäusen

Gefrorenes, myokardiales Gewebe der Maus wurde mittels eines Hammers aus Aluminium unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und auf Eis in Homogenisationspuffer II (s. 7.1.) mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®]) dreimal für 10 sec homogenisiert. Die Proben wurden für 20 min (15 800 x g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand als Homogenat bezeichnet.

3.6.2. Herstellung [³²P]-markierter Phosphorylase a

Ein klassisches in vitro-Substrat der PP1 und PP2A ist die Phosphorylase a. Für die Herstellung von [³²P]-markierter Phosphorylase a (Ahmad et al. 1989, DePaoli-Roach 1984) wurde Phosphorylase-Kinase-Lösung (s. 7.1.) mit 1 mCi γ -[³²P]-ATP für 150 min bei 30°C inkubiert. Die [³²P]-markierte Phosphorylase a wurde durch Zugabe von 3 Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und für 20 min bei 12 000 × g und 4°C (Centrikon Typ T-124, Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz) zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden in zwei ml Dialysepuffer (s. 7.1.) in einem semipermeablen Dialyseschlauch (Servapor[®], Serva, Heidelberg) zweimal gegen je fünf l Puffer dialysiert und anschließend bei 4°C gelagert.

3.6.3. PP-Assay

Die Bestimmung der Phosphataseaktivität (PP-Aktivität) wurde nach Neumann et al. (1991) durchgeführt. Als Substrat wurde [³²P]-markierte Phosphorylase a eingesetzt und die Freisetzung von radioaktivem Orthophosphat als Maß der PP-Aktivität ermittelt. Bei verminderter Aktivität der Phosphatasen, wird weniger radioaktiv markiertes Phosphat abgespalten und es werden weniger radioaktive Zerfälle im Szintillationszähler gemessen. Es wurden 10 µl Homogenat (s. 3.6.1.) entweder mit 20 µl Okadasäure (50 nM) oder 20 µl DMSO für 10 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion mit Zugabe von 20 µl [³²P]-Phosphorylase a-enthaltendem Reaktionsansatz gestartet (s. 7.1.). Die Vorverdünnung des Homogenates wurde jeweils durch Vorversuche optimiert. Es durften maximal 15-20% der Aktivität des Ansatzes umgesetzt werden, um die Freisetzungsgeschwindigkeit des Orthophosphates nicht durch eine abnehmende Substratmenge zu limitieren. Nach 30 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Trichloressigsäure (50%) und 30 µl einer zwei prozentigen Albuminlösung aus Rinderserum (BSA, Sigma, Steinheim) beendet. Dadurch wurden sämtliche Proteine in der Lösung gefällt. Nur das durch die Proteinphosphatasen abgespaltene radioaktive Phosphat verblieb in Lösung. Nach Fällung auf Eis (10 min) wurde die Suspension bei 15 000 × g für 5 min in der Tischzentrifuge Modell 5417 C (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Aktivität in 70 µl des Überstandes in einem Szintillationszähler (Canberra Packard, Dreieich) gemessen. Zur Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität wurde PP2A in den Homogenaten mit 10 nM Okadasäure gehemmt. Für die Gesamtaktivität wurden die jeweiligen Homogenate ohne Okadasäure im Versuch mitgeführt.

3.7. Messung der Ca²⁺-Transienten

Die Messung der Ca²⁺-Transienten erfolgte mit dem Ca²⁺-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 (Grynkiewicz et al. 1985). Für die Färbung der Zellen wurde das membranpermeable Acetoxymethylester-Derivat von Indo-1 (Indo-1/AM, Molecular Probes, Eugene, USA,

publiziert in Tsien 1981) verwendet. Nach Eintritt in die Zelle wurden die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten und der Farbstoff in seine Ca^{2+} -sensitive Form überführt. Der Indikator wurde durch eine Xenon-Lampe mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und die anteilige Emission der durch Indo-1 erzeugten längerwelligen Strahlung bei 405 und 495 nm durch zwei Photomultiplier registriert (PTI, Princeton, USA). Nach Ca^{2+} -Bindung verschob sich die maximale Emission von 495 nm zu 405 nm. Der Quotient der Emissionen 405/495 (Ratio) wurde als relatives Maß für die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol verwendet. Das grünfluoreszierende Protein störte die Ca^{2+} -Transientenmessungen nicht, da es bei 489 nm angeregt wird und bei 508 nm emittiert. Alle Experimente wurden bei 25°C durchgeführt, um einen Verlust von Indo-1 aus dem Intrazellularraum, der bei höheren Temperaturen auftritt, während der Messungen zu vermeiden (Di Virgilio et al. 1988, Kao 1994).

Messung der Ca^{2+} -Transienten an neonatalen Rattenkardiomyozyten

Kultivierte Kardiomyozyten wurden einmal mit Medium gewaschen. Die Kardiomyozyten wurden in Meßpuffer mit 25 μM Indo-1/AM und 2.5% Pluronic F-127 für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Meßpuffer perfundiert (0.8 ml/min), um den nicht aufgenommenen Farbstoff vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0.5 Hz elektrisch stimuliert. Das Signal einer einzelnen Zelle wurde über mehrere Minuten registriert.

Auswertung der Messung

25 einzelne Transienten einer Zelle wurden mit der Felix-Software (Photon Technologie International, Brunswick, USA) ausgewertet, gemittelt und ein einzelner Transient dargestellt. Bestimmt wurden für jeden Transienten: $t_{50\%}$ (Zeit in der die Ca^{2+} -Konzentration um 50% abgenommen hat), $t_{90\%}$ (Zeit in der die Ca^{2+} -Konzentration um 90% abgenommen hat), p_{max} (maximale Amplitudenhöhe, Differenz aus systolischer und diastolischer Ca^{2+} -Konzentration), die diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die systolische Ca^{2+} -Konzentration. Je Virus wurden 9-12 Messungen ausgewertet und die Werte gemittelt.

3.8. Statistische Auswertung

Aus mehreren unabhängigen Einzelversuchen wurden das arithmetische Mittel und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet und als Mittelwert \pm SEM angegeben. Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student für unverbundene Stichproben ermittelt. P-Werte kleiner oder gleich 0.05 wurden als signifikant bewertet. Bei einem Vergleich von drei und mehr Gruppen wurde die statistische Signifikanz

durch einen ANOVA-Test festgestellt, an den sich ein Bonferroni-Test für verbundene und unverbundene Stichproben anschloß (Wallenstein et al. 1980).

3.9. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Zucht und Haltung von genetisch veränderten Mäusen und zur Durchführung der Tierversuche und Organentnahmen lagen vor (Genehmigungsnummer G 50/00 und A31/97 des Regierungspräsidenten Münster).

Die genetischen Arbeiten erfolgten gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz-GenTG) vom 16. Dezember 1993 unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und -maßnahmen. Die Genehmigung bzw. Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Proteinphosphatasenexpression in humanen Ventrikeln und Koronararterien

4.1.1. Untersuchung der PP2A_{A α}

Die strukturelle Untereinheit A α der PP2A (PP2A_{A α}) ist mit der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2A_{C α}) verbunden und bildet eine Struktur, an die regulatorische Untereinheiten wie B56 α binden können (Gergs et al. 2004).

Um die Beteiligung der PP2A und ihrer Untereinheiten bei der Herzinsuffizienz zu untersuchen, wurde die strukturelle Untereinheit der PP2A mittels Western Blot in humanen Ventrikeln nachgewiesen. Als Proben wurden Herzen von Patienten untersucht, welche sich im terminalen Stadium einer Herzinsuffizienz, der ischämischen (**ICM**) oder dilatativen Kardiomyopathie (**DCM**), befanden. Herzproben von Patienten, die keine Herzinsuffizienz (**NF**) hatten, dienten als Kontrolle. Es wurden die Herzproben des linken Ventrikels nur mit anderen Herzproben des linken Ventrikels verglichen, bei Herzproben des rechten Ventrikels wurde genauso verfahren, um Unterschiede zwischen den Ventrikeln auszuschließen. Die Herzproben wurden homogenisiert (s. 3.5.1.) und PP2A_{A α} durch einen spezifischen Antikörper (s. 3.5.5.) nachgewiesen und quantifiziert. PP2A_{A α} konnte in Homogenaten von ICM- und DCM- sowie in NF-Herzen nachgewiesen werden. Dabei war die Proteinexpression von PP2A_{A α} in den NF-, ICM- und DCM-Herzen nicht signifikant verändert, weder im linken noch im rechten Ventrikel (s. Abb. 4.1.).

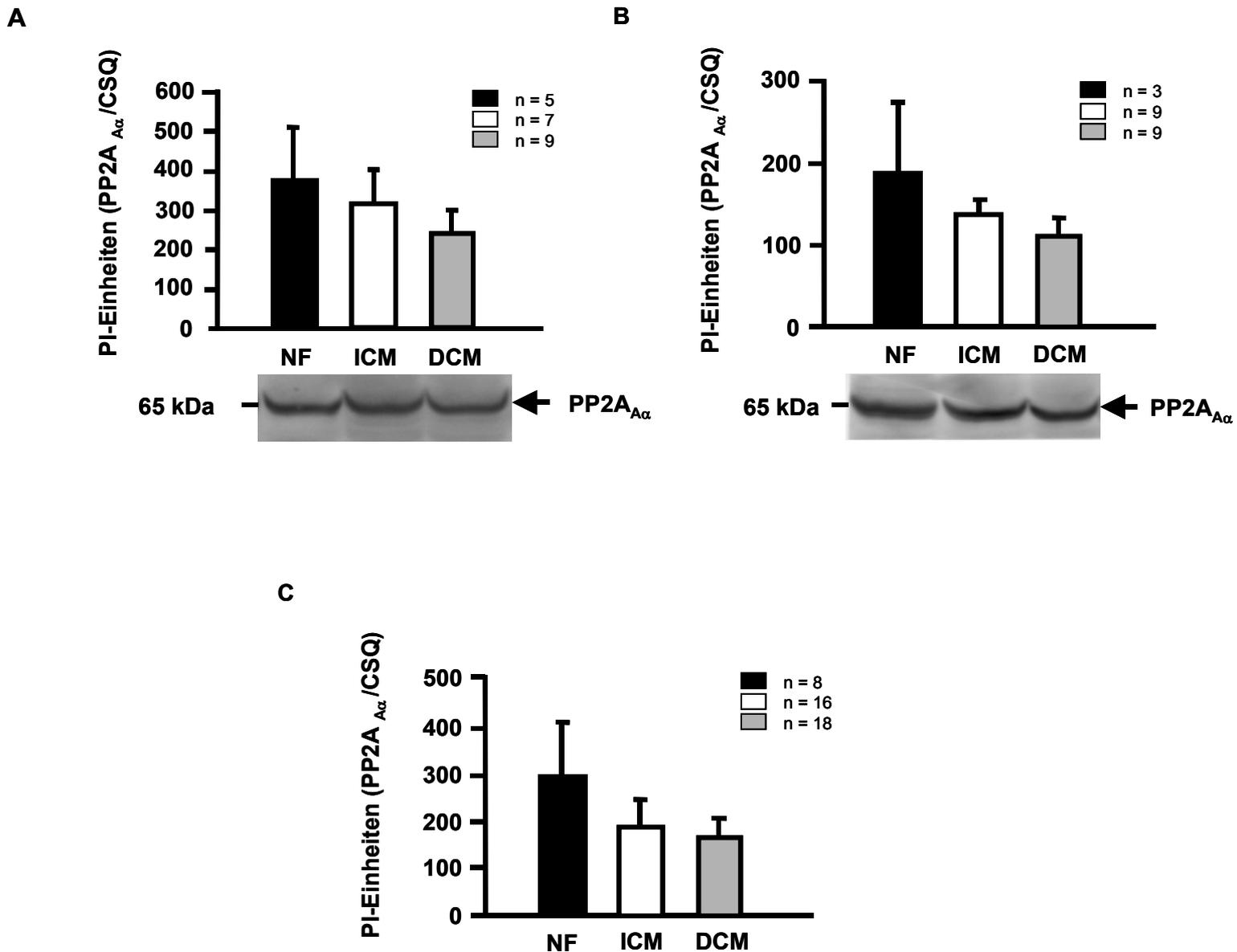


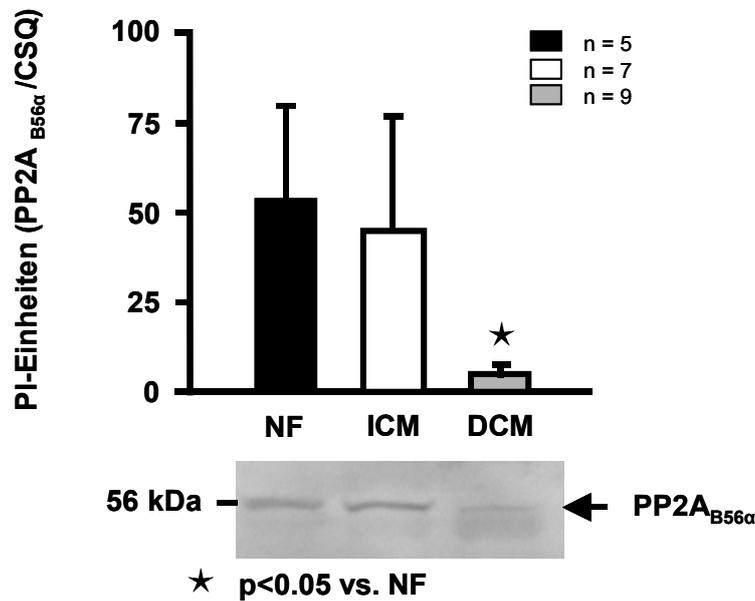
Abb. 4.1.: Expression von PP2A_{Aα} in humanen Herzproben

Untersucht wurden humane Herzproben von Patienten, die entweder keine (**NF**), eine ischämische (**ICM**) oder eine dilatative Kardiomyopathie (**DCM**) im Endstadium hatten. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von PP2A_{Aα} in Homogenaten des rechten (**A**) bzw. linken (**B**) Ventrikels des Herzens. Eingesetzt wurden 80 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet. Die Daten von beiden Ventrikeln sind in einer Abb. (**C**) zusammengefaßt worden. Die Höhe der Säule stellen das arithmetische Mittel und die Streuungsbalken stellen den Standardfehler dar.

4.1.2. Untersuchung der PP2A_{B56α}

Die Untereinheit B56α der PP2A (PP2A_{B56α}) ist eine der zahlreichen regulatorischen Untereinheiten der PP2A (s. 1.3.) und bindet an den Komplex aus PP2A_{Aα} und PP2A_{Cα}. PP2A_{B56α} kommt im Zytoplasma der Herzmuskelzelle vor (McCright et al. 1996), so dass PP2A_{B56α} an der Herzinsuffizienz beteiligt sein könnte. Aus diesem Grund wurde PP2A_{B56α} mittels Western Blot (s. 3.5.1.ff) mit spezifischen Antikörpern (s. 7.2.) in den Herzhomogenaten der oben genannten Patientengruppen (**NF**, **ICM** und **DCM**) nachgewiesen. Es wurden erneut nur die Herzproben des linken Ventrikels mit anderen Herzproben des linken Ventrikels verglichen bzw. nur Herzproben des rechten Ventrikels miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen den Ventrikeln auszuschließen. PP2A_{B56α} konnte in den Homogenaten von NF-, ICM- und DCM-Hezen nachgewiesen werden. Dabei war die Proteinexpression von PP2A_{B56α} in Homogenaten von DCM-Hezen signifikant erniedrigt, jedoch in ICM-Hezen war sie gegenüber der Kontrolle (**NF**) unverändert (s. Abb. 4.2.). Diese Ergebnisse konnten sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel festgestellt werden.

A



B

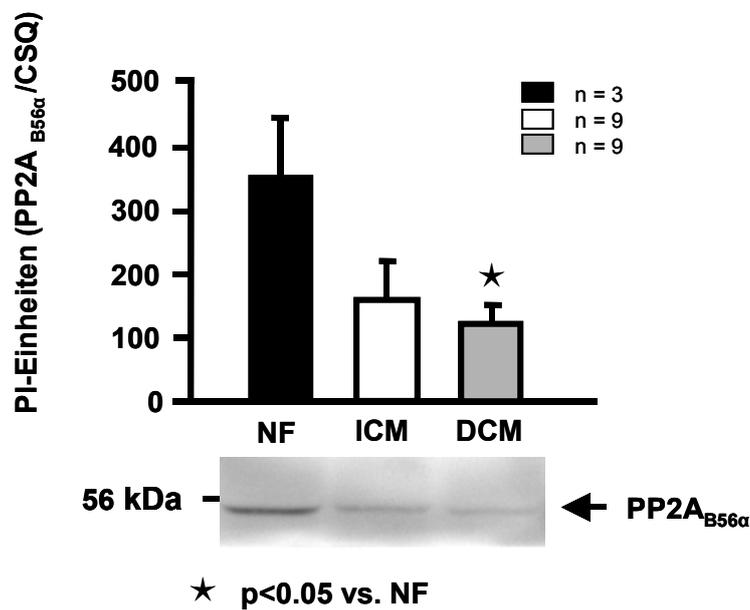


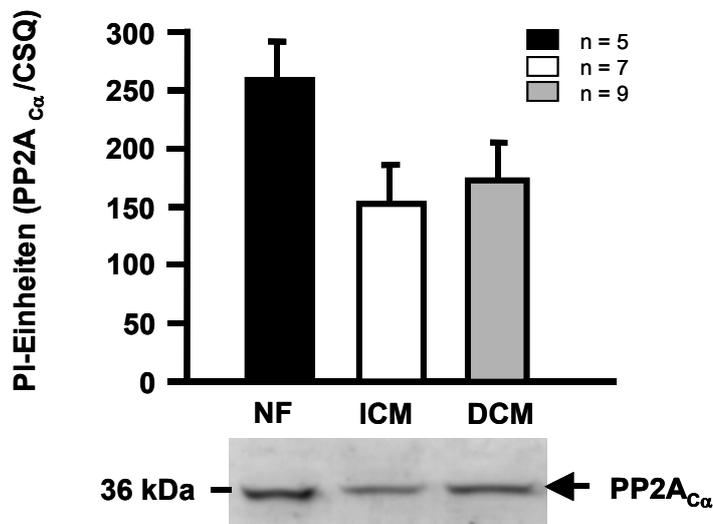
Abb. 4.2.: Expression von PP2A_{B56α} in humanen Herzproben

Untersucht wurden humane Herzproben von Patienten, die entweder keine (**NF**), eine ischämische (**ICM**) oder eine dilatative Kardiomyopathie (**DCM**) im Endstadium hatten. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von PP2A_{B56α} in Homogenaten des rechten (**A**) bzw. linken (**B**) Ventrikels des Herzens. Eingesetzt wurden 80 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet. Die Höhe der Säule stellen das arithmetische Mittel und die Streuungsbalken stellen den Standardfehler dar.

4.1.3. Untersuchung der PP2A_{Cα}

Die katalytische Untereinheit der PP2A (PP2A_{Cα}) ist fest verbunden mit der strukturellen Untereinheit Aα. PP2A_{Cα} ist das aktive Zentrum der PP2A und verantwortlich für die Substratumsetzung. Um zu untersuchen, ob PP2A_{Cα} an der Entstehung der humanen Herzinsuffizienz, wie beim überexprimierenden Mausmodell (Gergs et al. 2004) gezeigt, beteiligt ist, wurde PP2A_{Cα} wieder in humanen Herzhomogenaten, der schon beschriebenen Patientengruppen (**NF**, **ICM** und **DCM**) nachgewiesen. Es wurden erneut nur die Herzproben des linken Ventrikels mit anderen Herzproben des linken Ventrikels verglichen bzw. nur Herzproben des rechten Ventrikels miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen den Ventrikeln auszuschließen. Auch PP2A_{Cα} konnte in den Homogenaten von NF-, ICM- und DCM-Hezen nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen war im linken Ventrikel eine signifikante Abnahme der Proteinexpression von PP2A_{Cα} bei ICM- sowie bei DCM-Hezen zu sehen (s. Abb. 4.3.). Die Proteinexpression war in den ICM bzw. DCM-Hezen um die Hälfte geringer als in den NF-Hezen. Parallel dazu war im rechten Ventrikel zwar eine Abnahme der Proteinexpression zu sehen, jedoch war diese nicht signifikant, der P-Wert NF gegenüber ICM liegt bei 0.0561.

A



B

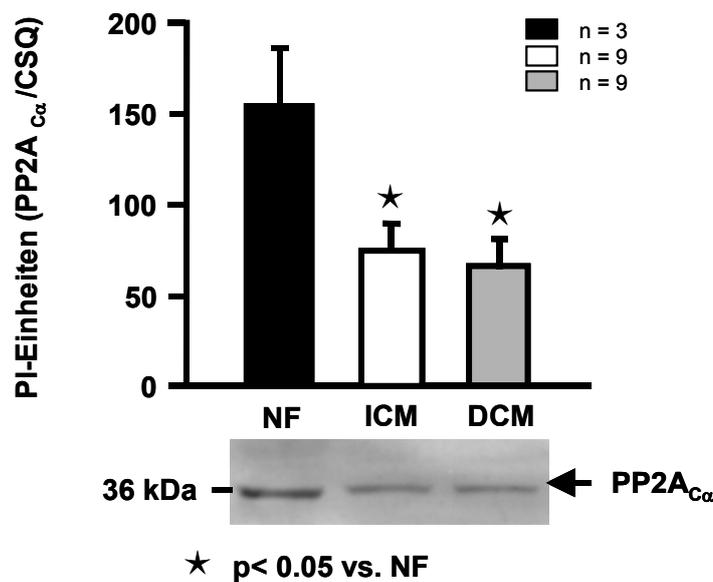
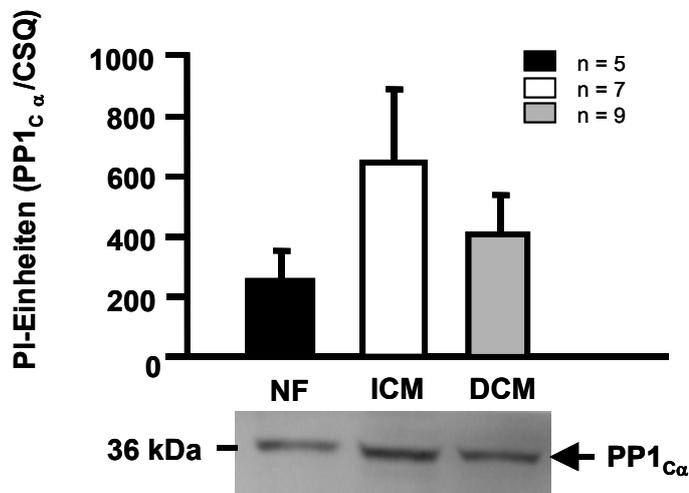
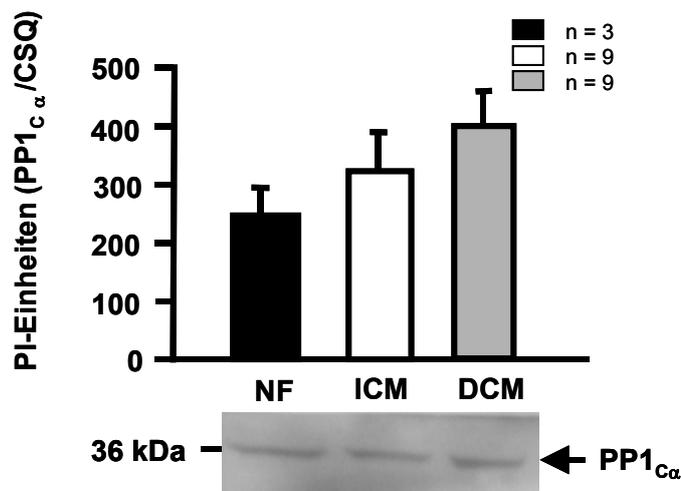


Abb. 4.3.: Expression von PP2A_{Cα} in humanen Herzproben

Untersucht wurden humane Herzproben von Patienten, die entweder keine (NF), eine ischämische (ICM) oder eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) im Endstadium hatten. Dargestellt ist ein immunologische Nachweis von PP2A_{Cα} in Homogenaten des rechten (A) bzw. linken (B) Ventrikels des Herzens. Eingesetzt wurden 80 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet. Die Höhe der Säule stellen das arithmetische Mittel und die Streuungsbalken stellen den Standardfehler dar.

4.1.4. Untersuchung der PP1_{Ca}

Es ist bekannt, dass bei der terminalen Herzinsuffizienz des Menschen die Aktivität der Proteinphosphatasen höher ist, als in entsprechenden Präparaten aus nicht-insuffizienten Herzen. Diese Erhöhung ging mit einer gesteigerten Expression der katalytischen Untereinheit der PP1 (PP1_{Ca}) einher (Mishra 2002, Neumann et al. 1997). Deshalb wurde als Kontrolle unserer Herzproben (**NF**, **ICM** und **DCM**) die Expression der PP1_{Ca} mittels Western Blot (s. 3.5.1.ff) überprüft. Es wurden erneut nur die Herzproben des linken Ventrikels mit anderen Herzproben des linken Ventrikels verglichen bzw. nur Herzproben des rechten Ventrikels miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen den Ventrikeln auszuschließen. Bei ICM und DCM-Hezen wurde im rechten und linken Ventrikel ein leichter Anstieg der PP1 nachgewiesen, der jedoch nicht signifikant war.

A**B****Abb. 4.4.: Expression von PP1_{cα} in humanen Herzproben**

Untersucht wurden humane Herzproben von Patienten, die entweder keine (**NF**), eine ischämische (**ICM**) oder eine dilatative Kardiomyopathie (**DCM**) im Endstadium hatten. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von PP1_{cα} in Homogenaten des rechten (**A**) bzw. linken (**B**) Ventrikels des Herzens. Eingesetzt wurden 80 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet. Die Höhe der Säule stellen das arithmetische Mittel und die Streuungsbalken stellen den Standardfehler dar.

4.1.5. Untersuchung von CSQ

In allen Western Blot Untersuchungen diente Calsequestrin (CSQ) als Referenz für die Proteinbeladung, bzw. als Marker für den Anteil an Herzmuskelzellen in der Probe, auf die alle Werte bezogen wurden, weil es auch bei einer Herzinsuffizienz unverändert exprimiert wird. Dies wurde mittels Western Blot in den bekannten Patientengruppen (**NF**, **ICM** und **DCM**) überprüft. Das Protein Calsequestrin war bei ca. 50 kDa zu detektieren. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

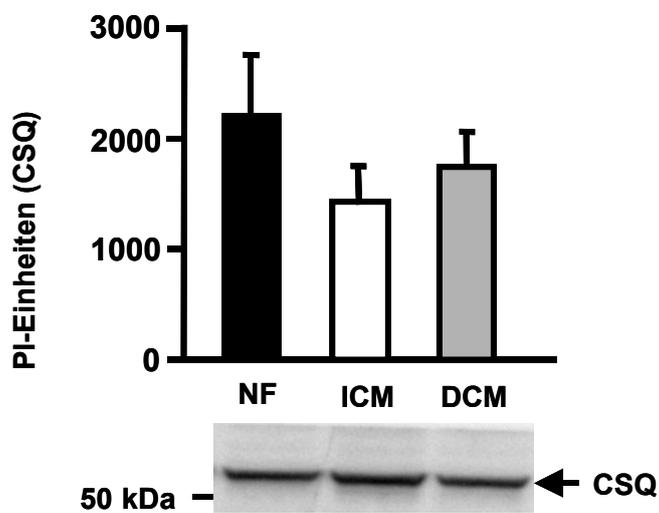


Abb. 4.5.: Expression von CSQ

Untersucht wurden humane Herzproben von Patienten, die entweder keine (**Non Failing**), eine ischämische (**ICM**) oder eine dilatative Kardiomyopathie (**DCM**) im Endstadium hatten. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von CSQ in Homogenaten des rechten Ventrikels des Herzens. Eingesetzt wurden 80 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet. Die Höhe der Säule stellen das arithmetische Mittel und die Streuungsbalken stellen den Standardfehler dar.

4.1.6. Untersuchung von PP2A_{B56α} in humanen Koronararterien

Es ist bekannt, dass koronare Herzerkrankungen zu einer Herzinsuffizienz führen können. Aufgrund der erniedrigten Proteinexpression der PP2A_{Cα} und PP2A_{B56α} in humanen insuffizienten Herzen, wurde die Proteinexpression von PP2A_{B56α} auch in humanen Koronararterien untersucht. Untersucht wurde nur die Expression von PP2A_{B56α} aufgrund der mangelnden Probenanzahl. Es wurden wieder die drei Patientengruppen (**NF**, **ICM** und **DCM**) untersucht. Signifikanzen konnten nicht errechnet werden, da nur eine NF-Probe zur Verfügung stand. Jedoch scheint die PP2A_{B56α}-Expression in DCM-Koronararterien im Vergleich zu ICM und NF-Proben erhöht.

Patientengruppe	n =	Phosphorlimer Einheiten(PI) (arith. Mittel ± Standardfehler)
NF	1	391
ICM	3	410 ± 126
DCM	5	642 ± 168

Tab. 4.1. Expression von PP2A_{B56α}

Untersucht wurden humane Proben aus Koronararterien von Patienten, die entweder keine (**NF**), eine ischämische (**ICM**) oder eine dilatative Kardiomyopathie (**DCM**) im Endstadium hatten. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von PP2A_{B56α} in Homogenaten der Koronararterien. Eingesetzt wurden 50 µg Gesamtprotein. Alle verwendeten Antikörper sind unter 7.2. aufgelistet.

4.2. Generierung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression des vollständigen Inhibitor 2 im Gegensatz zur bestehenden trunkierten Form

4.2.1. Generierung der transgenen Mäuse

Transgene Mäuse, welche ein trunkiertes I₂ herzspezifisch überexprimierten, wurden von Kirchhefer et al. (2005) veröffentlicht. Das in den transgenen Mäusen exprimierte I₂-Protein wies eine C-terminale Deletion von 64 Aminosäuren auf und hatte somit eine Größe von ca. 26 kDa. Das Molekulargewicht des gesamten I₂ beträgt laut Literaturangaben (Helps et al. 1994, Roach et al. 1985) etwa 31 kDa. Obwohl eine funktionell wichtige Phosphorylierungsstelle des I₂ an der Aminosäure Threonin 72 in dem trunkierten I₂ vorhanden ist, stellte sich die Frage, ob sich das trunkierte I₂ funktionell wie das vollständige I₂ verhält. Deshalb wurden transgene Mäuse, welche das vollständige I₂ unter Kontrolle des α -MHC-Promotors exprimierten (α -MHC-I₂ full length-Mauslinie), generiert. In dieser Arbeit wurde der Promotor des α -MHC-Gens (bp 3060 bis 8501) benutzt, der das Gen der schweren Kette des Myosins kontrolliert. Es wird postnatal in Kardiomyozyten exprimiert, und führt zu einem postnatalen Anstieg um das 2 bis 8-fache der mRNA der α -MHC. Zudem konnte in glatter Muskulatur (Uterus und Milz) sowie in anderen Geweben (Leber und Niere) das exprimierte Protein des Fremdgens nicht nachgewiesen werden (Gulick et al. 1991).

Zunächst wurde eine Expressionskassette kloniert, welche die kodierende Sequenz des humanen I₂ unter Kontrolle des α -MHC-Promotors enthielt (s. Abb. 4.6. **B**). Die I₂-Sequenz wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Bgl* II und *Not* I, der α -MHC-Vektor mit der Restriktionsendonuclease *Eco* ICR geschnitten und beide DNA-Fragmente ligiert (s. 3.4.5.). Die Plasmid-DNA wurde durch eine PCR (für die Genotypisierung der transgenen trunkierten I₂-Mauslinie) überprüft, ob die I₂-Sequenz korrekt integriert wurde (s. Abb. 4.6. **A**). Bei dieser PCR wurden die Primer so eingesetzt, dass der forward-Primer im Promotorbereich und der reverse-Primer in der I₂-Sequenz lag. Die Expressionskassette, des durch PCR gefundenen *E. coli*-Klones, wurde mit der Restriktionsendonuclease *Nru* I herausgeschnitten (s. Abb. 4.6. **C**) und mittels Sequenzierung untersucht. Nach erfolgreicher Überprüfung wurde die Expressionskassette in befruchtete Eizellen zur Integration in das Mausgenom mikroinjiziert (s. 3.4.7.1.). Aus einem Injektionszyklus gingen insgesamt 13 Jungtiere hervor, welche wie unter 3.4.10. ff beschrieben genotypisiert wurden. Die PCR dieser Tiere ist in Abb. 4.6. **D** zu sehen, dabei sind die Tiere 2, 4, 5, 7 und 11 transgen und stellen die Founder der Tierlinie dar. Founder sind Mäuse, die durch Mikroinjektion der Expressionskassette entstanden sind und das Transgen integriert haben.

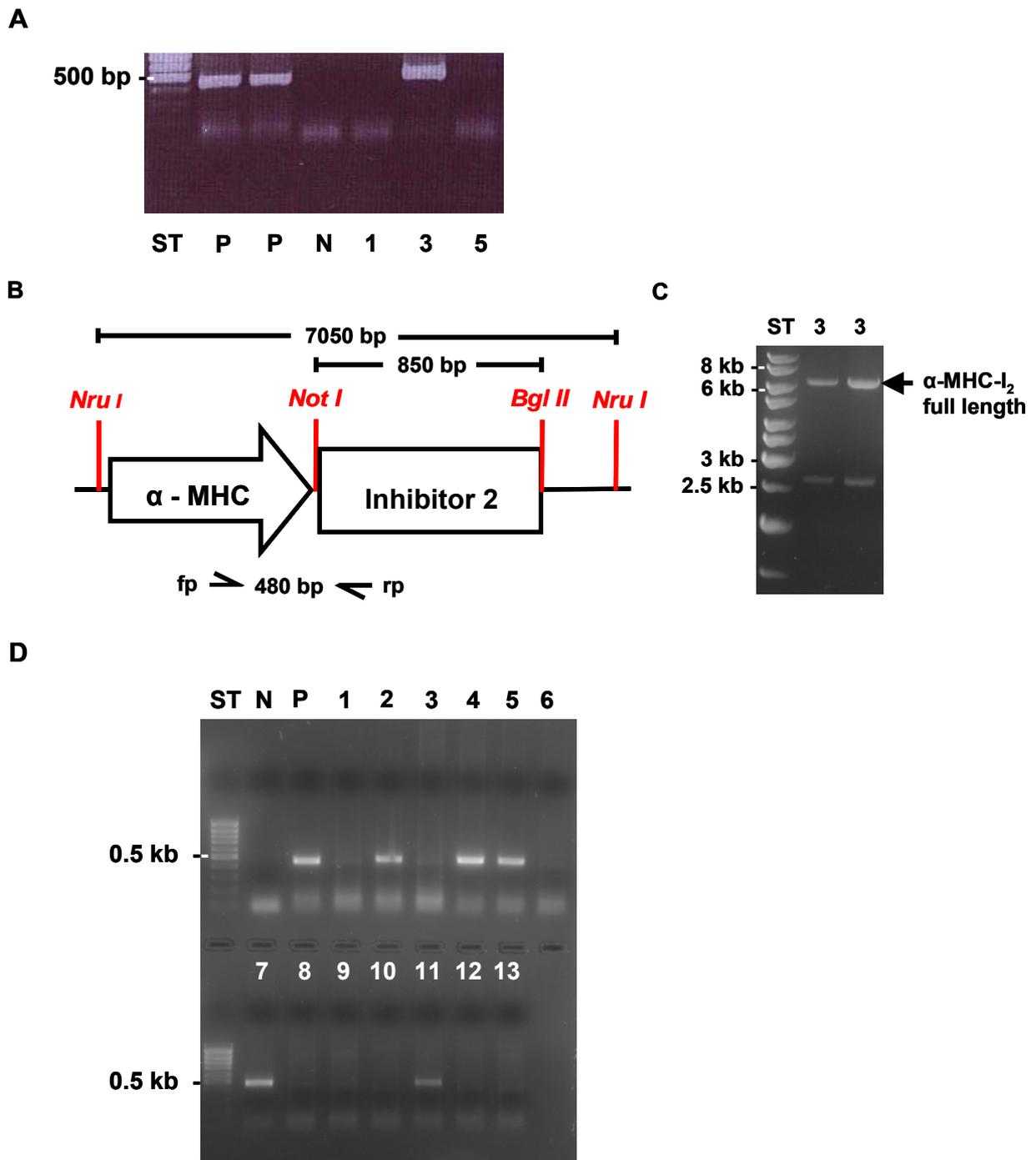


Abb. 4.6.: Generierung von transgenen α -MHC-I₂-full length-Mäusen

(A) Photographie einer PCR, aufgetragen auf ein Agarosegel. Plasmid-DNA, aus *E. coli*-Klonen (1-5), wurde mittels PCR, für die trunkierte α -MHC-I₂-Mauslinie auf Integration der I₂-Sequenz überprüft (s. Schema). (B) Schematische Darstellung des α -MHC-I₂-full length-Konstruktes (C) Photographie eines Agarosegels. Plasmid-DNA wurde mit der Restriktionsendonuclease *Nru I* inkubiert, die Expressionskassette (α -MHC-I₂-full length) isoliert und durch Sequenzierung erfolgreich überprüft. Verwendet wurde hier ein 1 kb DNA-Größenstandard (ST) (D) Diese Expressionskassette wurde in befruchtete Mausoozyten injiziert und die entstandenen Mäuse (1-13) genotypisiert, indem DNA aus der Schwanzspitze mittels PCR auf Integration von α -MHC-I₂ untersucht wurde.

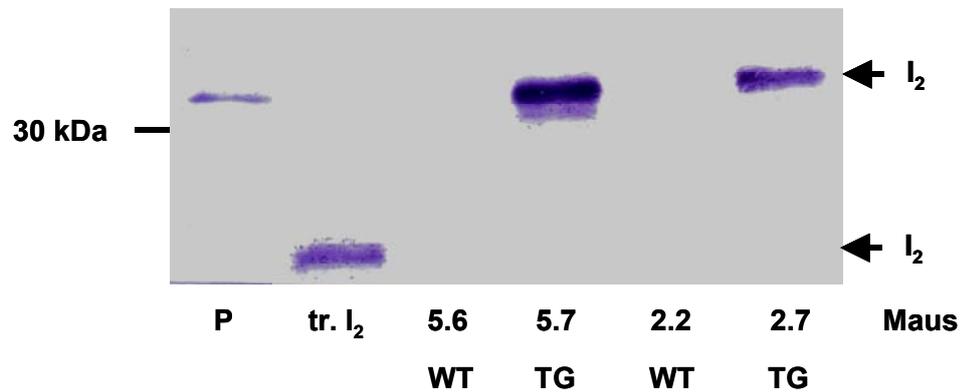
P: Positivkontrolle N: Negativkontrolle ST: 100 bp DNA-Größenstandard.

4.2.2. Charakterisierung der Proteinexpression von transgenen α -MHC-I₂-full length-Mäusen (I₂-full length-Mäusen)

Nachdem die Integration der α -MHC-I₂-full length-Sequenz in das Mausgenom durch PCR nachgewiesen wurde, mußte überprüft werden, ob und wie stark die Proteinexpression von I₂ in den Herzmuskelzellen war. Das Protein wurde in Herzhomogenaten von transgenen I₂-full length-Mäusen durch Western Blot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und quantifiziert. Als Kontrollen dienten Wildtyp Geschwistertiere. Das I₂ kann in transgenen α -MHC-I₂-Mäusen, aber nicht in Wildtyp- (WT) Mäusen nachgewiesen werden, da die Menge an I₂ in WT-Mäusen unter der Nachweisgrenze liegt. In transgenen α -MHC-I₂-Mäusen (trunkiert) kann es bei einem Molekulargewicht von 26 kDa nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde rekombinantes I₂ mit einem Molekulargewicht von 31 kDa benutzt. Das vollständige I₂ hat, wie das rekombinante I₂, ein Molekulargewicht von 31 kDa und konnte nachgewiesen werden (s. Abb. 4.7. **A**).

Danach wurde bei der ersten Folgegeneration, von allen erhaltenen I₂-full length-Foundern, die I₂-Proteinexpression untersucht (s. 4.7. **B**). Dabei fiel auf, dass zwischen den Foundern Unterschiede in der Stärke der I₂-Expression bestanden. Der Founder 2 hatte die geringste I₂-Expression im Herzen, alle anderen Founder hatten eine hohe I₂-Expression.

A



B

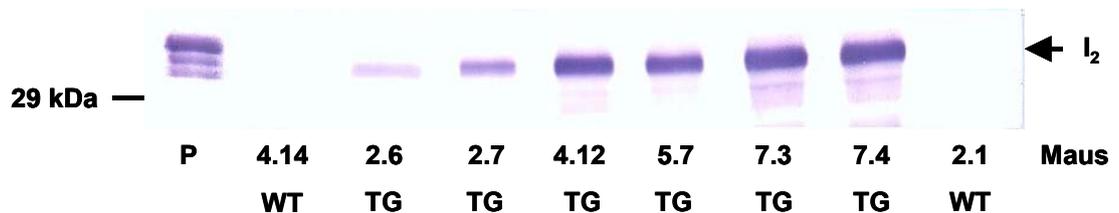


Abb. 4.7.: Charakterisierung der I₂-Expression im Herzen von transgenen α -MHC-I₂-full length-Mäusen (I₂-full length-Mäusen)

(A) Nachweis der I₂-Expression in 50 μ g Gesamtprotein von WT-, trunkierten I₂ (tr. I₂) und I₂-full length-Mäusen (TG). Rekombinantes I₂ diene als Positivkontrolle (P). (B) Nachweis der I₂-Expression in 50 μ g Gesamtprotein von WT-Mäusen und von Nachkommen der verschiedenen I₂-full length-Foundern.

Um die Spezifität des I₂-Signals zu testen, wurden in der Western Blot-Analyse zusätzlich Verdrängungsexperimente mit rekombinantem I₂ aus *E. coli* (rek.I₂, von Sigma, Steinheim) durchgeführt. Dieses Experiment sollte den Verdacht der unspezifischen Antikörperbindung des I₂-Antikörpers ausräumen. Das in transgenen I₂-full length-Mäusen detektierte Signal konnte durch Präinkubation des I₂-Antikörpers mit 3 μ g rekombinantem I₂ unterdrückt werden (s. Abb. 4.8.), das unspezifische Signal jedoch wurde nicht verdrängt.

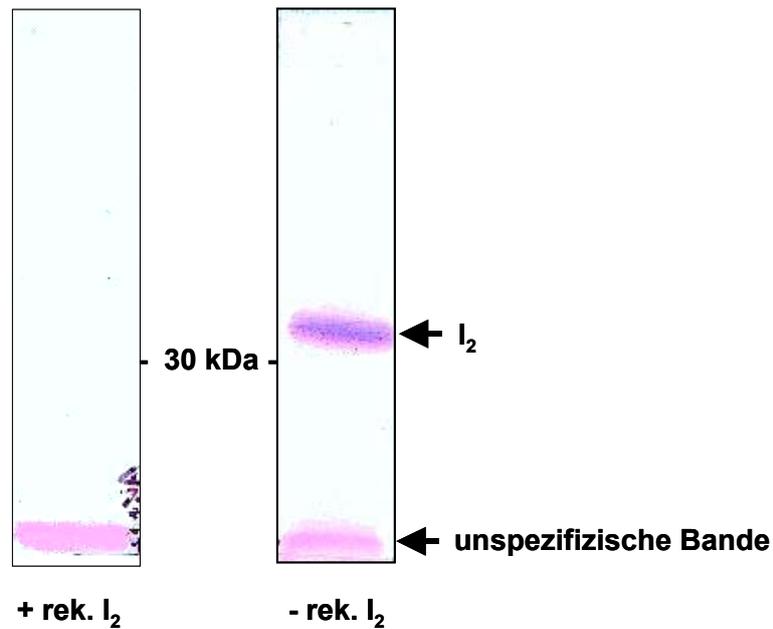


Abb. 4.8.: Verdrängung des I₂-Signals in Western Blots von Herzhomogenaten einer I₂-full length-Maus durch rek. I₂

Die durch SDS-Page separierten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die einzelnen Spuren ausgeschnitten. Der I₂-Antikörper wurde mit 3 µg rekombinarem I₂ aus *E. coli* (**rek. I₂**) für 12 Stunden bei 4°C vorinkubiert (Verdrängungsexperiment) und für den immunologischen Nachweis verwendet. Das I₂ wurde mit einem zweiten Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt war, detektiert.

Danach wurde die Proteinexpression von PP1_{Cα} als direkter Interaktionspartner von I₂ untersucht. PP1_{Cα} kann sowohl in transgenen I₂-full length-Mäusen als auch in WT-Mäusen nachgewiesen werden und hat ein Molekulargewicht von 36 kDa. In I₂-full length-Mäusen ist die Expression von PP1_{Cα} um 30% gegenüber den WT-Mäusen erhöht (s. Abb. 4.9.).

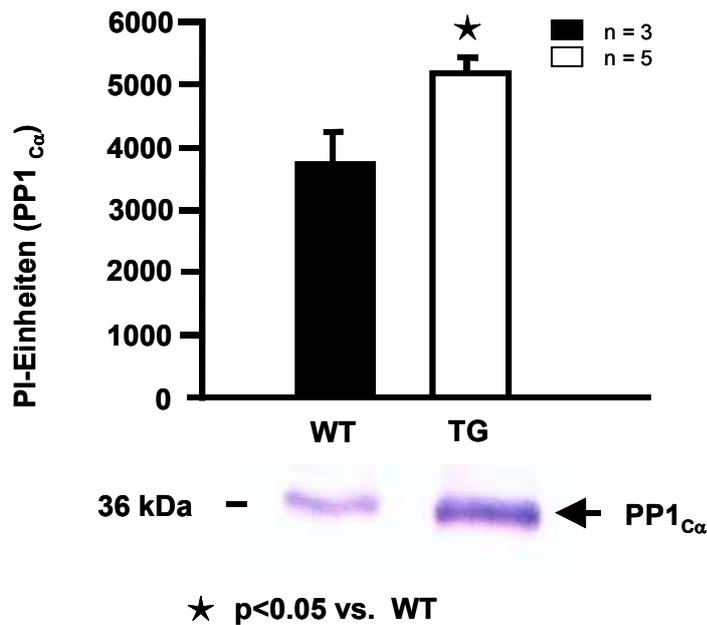


Abb. 4.9.: Expression von PP1_{Cα} in Herzhomogenaten von transgenen I₂-full length- und WT-Mäusen

Dargestellt ist beispielhaft eine Photographie einer Nitrozellulosemembran und die Quantifizierung des immunologischen Nachweises von PP1_{Cα} in Herzen von WT- und transgenen I₂-full length-Mäusen. Eingesetzt wurden 50 µg Gesamtprotein. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers (Storm 860) und der ImageQuant-Software und wurde auf der Ordinate in PhosphorImager Einheiten (PI-Einheiten) angegeben.

Außerdem wurde die Expression des Markerproteins CSQ untersucht, welches zwischen WT- und transgenen Mäusen nicht verändert war.

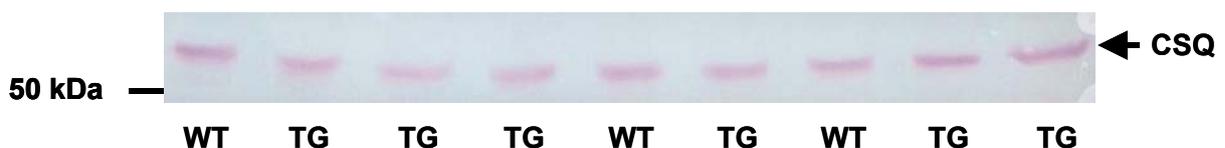


Abb. 4.10.: Expression von CSQ in Herzhomogenaten von transgenen I₂-full length- und WT-Mäusen

Dargestellt ist eine Photographie einer Nitrozellulosemembran und eine Quantifizierung eines immunologischen Nachweises von CSQ in Herzen von WT- und transgenen I₂-full length-Mäusen. Eingesetzt wurden 50 µg Gesamtprotein. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers (Storm 860) und der ImageQuant-Software. Es konnte kein Unterschied zwischen WT und TG-Mäusen nachgewiesen werden.

4.2.3. Immunhistologie von transgenen I₂-full length-Mäusen

Der nächste Schritt in den Untersuchungen war eine Immunhistologie von transgenen und WT-Herzschnitten. Es wurde überprüft, in welchen Zellen I₂ exprimiert wird, die Verteilung von I₂ im Herzgewebe und die Lokalisation von I₂ in den Kardiomyozyten. Es wurden Herzproben von WT- und je einem Nachkommen der jeweiligen Founder in Paraffin eingebettet und mit dem Antikörper gegen das humane I₂ inkubiert und photographiert (s. 3.5.9.). Der verwendete Antikörper reagiert nicht mit endogenem I₂, so dass nur in transgenen I₂-full length Mäusen I₂ angefärbt wurde. Die Lokalisation von I₂ wurde durch den Farbstoff Streptavidin-Alexa-488 in Form von grünen Komplexen, bestehend aus I₂, 1. und 2. Antikörper und dem Farbstoff, sichtbar gemacht. Bei dem WT-Herz konnte, wie erwartet, kein I₂ nachgewiesen werden (s. Abb. 4.11. **A**). Bei den transgenen I₂-full length-Mäusen konnten drei Ergebnisse festgestellt werden, jedes Ergebnis in einer anderen Mauslinie. Eine flächendeckende Verteilung (s. Abb. 4.11. **D**, **E**) und eine zum Herzlumen gerichtete Verteilung von I₂ (s. Abb. 4.11. **C**) wurde nachgewiesen. In der dritten Form der I₂-Verteilung war I₂ flächendeckend vorhanden, jedoch gab es viele Areale, in denen I₂ nicht exprimiert wurde. Dies wird als Mosaizismus bezeichnet (s. Abb. 4.11. **B**), da die Verteilung des I₂ wie ein Mosaik aussieht. Bei allen Schnitten der transgenen I₂-full length-Mäuse ist I₂ sichtbar, das sich an die Aktin-Myosin-Filamente anlagert (In den Schnitten als Querstreifung zu sehen).

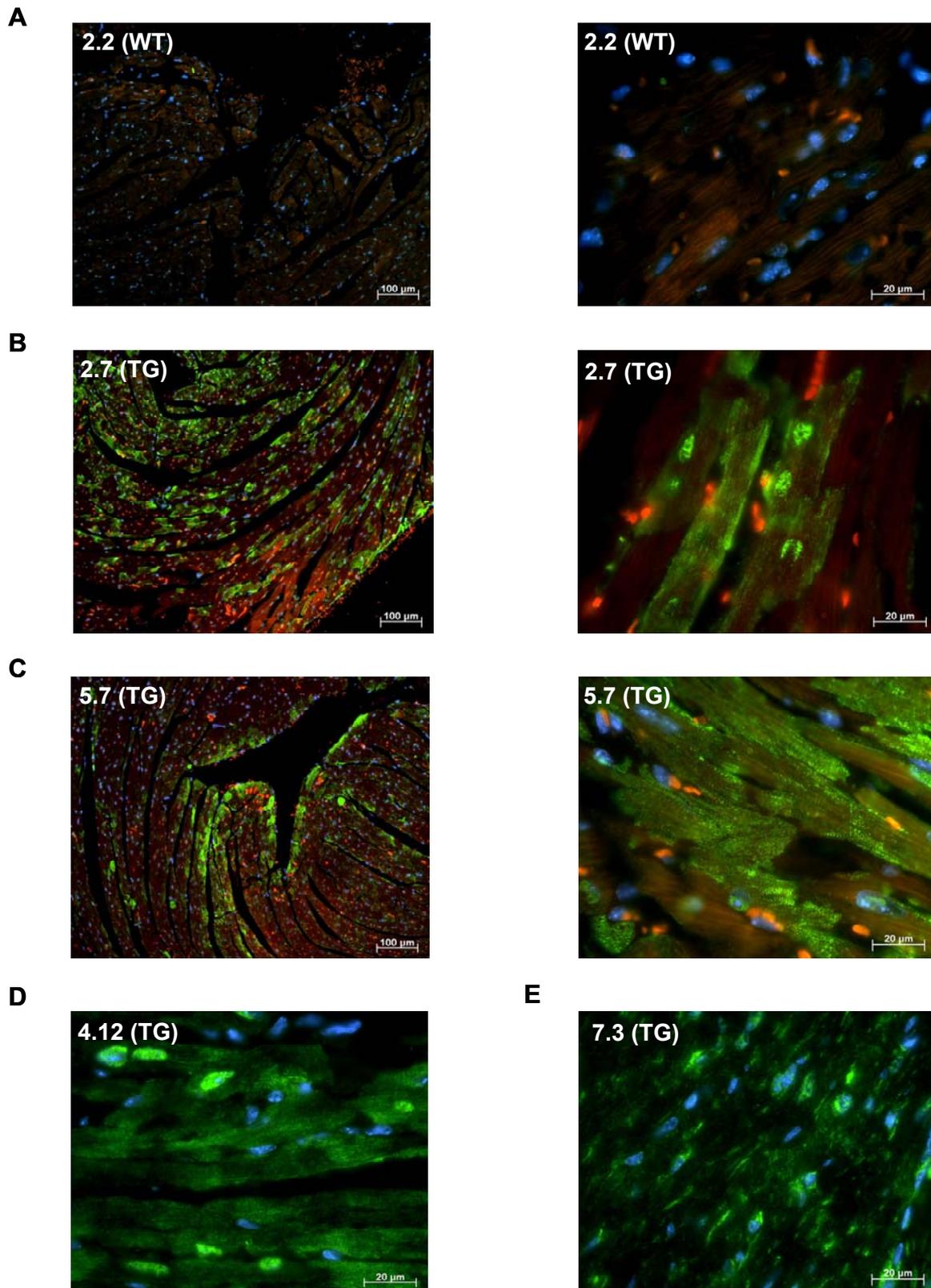


Abb. 4.11.: Immunhistologischer Nachweis von I₂ in Herzen von transgenen I₂-full length-Mäusen
 Schnitte von Ventrikelgewebe aus WT- (A) und verschiedenen I₂-Mäusen (B-E) wurden mit einem Antikörper gegen humanes I₂ inkubiert. **grün:** Humanes I₂ **blau:** Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) **rot:** Autofluoreszenz von Gewebe insbesondere Erythrozyten.

Danach wurde von 2 Herzschnitten, verschiedener transgener I_2 -full length-Mäuse, eine Dekonvolution, d.h. eine 3D-Rekonstruktion, von einer Region um einen Zellkern herum angefertigt, um zu untersuchen, ob I_2 auch im Zellkern oder nur im Zytoplasma vorhanden ist. Bei beiden Mäusen konnte I_2 im Kern und im Zytoplasma nachweisen werden (s. Abb. 4.12.). Dieses Ergebnis erlaubt keine Aussage darüber, ob I_2 im Kern eine Funktion besitzt oder nicht.

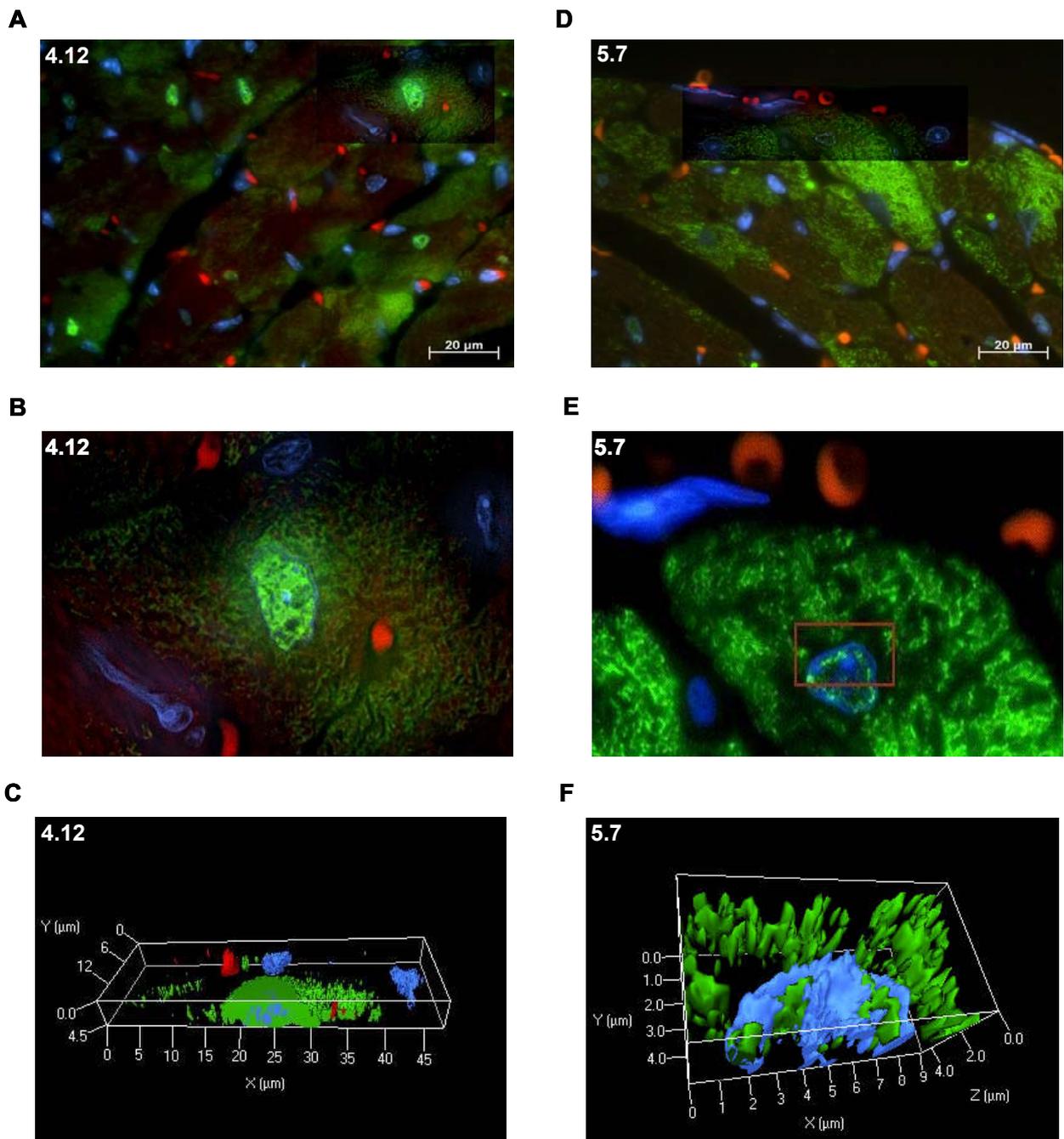


Abb. 4.12.: Immunhistologischer Nachweis von I_2 im Kern

Schnitte von Ventrikelgewebe aus zwei verschiedenen I_2 -full length-Mäusen [4.12 (A-C)] [5.7 (D-F)] wurden mit einem Antikörper gegen humanen Inhibitor-2 inkubiert. Humanes I_2 färbte sich grün an, Kerne stellen sich blau dar. Durch Dekonvolution eines bestimmten Areals (Kasten s. A,D und E), konnte I_2 in

beiden Schnitten im Kern nachgewiesen werden. Es wurde der in **A** und **D** markierte Bereich vergrößert (**B**, **E**), und danach mit Hilfe des Computers die 3D-Anordnung der Fluoreszenz in den Schnittebenen rekonstruiert (**C**, **F**).

4.2.4. Bestimmung der Phosphataseaktivität in Herzhomogenaten von I₂-full length-Mäusen

Nachdem die Proteinexpression der I₂-full length-Mäuse charakterisiert worden war, mußte die Phosphataseaktivität von Herzhomogenaten untersucht werden, um zu ermitteln, ob das überexprimierte I₂ funktionell aktiv ist, d.h. einen inhibitorischen Effekt auf die PP1 hat. Deshalb wurden Herzhomogenate von transgenen Tieren und Wildtyp-Mäusen hergestellt (s. 3.6.1.) und in einen PP-Assay mit [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat eingesetzt (s. 3.6.3.). Das freigesetzte [³²P]-Phosphat wurde gemessen und galt als Maß für die Phosphataseaktivität (PP-Aktivität). Die gemessene PP-Aktivität in den Homogenaten setzt sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (1 mM EDTA, Abwesenheit von zweiwertigen Kationen) aus PP1 und PP2A zusammen, die beide [³²P]-Phosphorylase a dephosphorylieren. Die spezifische PP-Aktivität (in einer Minute umgesetzte Phosphorylase a pro mg eingesetztes Protein (nmol/mg Protein/min) war in Herzhomogenaten von transgenen I₂-full length-Mäusen mit 0.63±0.04 nmol/mg Protein/min um die Hälfte geringer als die der WT-Mäuse mit 1.48±0.24 nmol/mg Protein/min. Die spezifische PP-Aktivität bei den transgenen I₂-Mäusen (trunkiert) lag mit 0.51±0.19 nmol/mg Protein/min im Bereich der transgenen I₂-full length-Mäuse. Um nun zwischen der PP1- und der PP2A-Aktivität unterscheiden zu können, wurde der Proteinphosphatasehemmstoff Okadasäure (OA) zu allen Proben hinzugegeben. Es wurden 10nmol OA verwendet, eine Menge bei der nur die PP2A-Aktivität vollständig gehemmt wird. Die PP1-Aktivität bleibt unbeeinflusst.

Nachdem alle Proben 10 min mit 10 nmol OA inkubiert worden waren, nahm die PP-Aktivität bei WT-Mäusen auf 0.39±0.05 nmol/mg Protein/min ab. Bei den transgenen I₂-full length-Mäusen war mit 0.05±0.03 nmol/mg Protein/min kaum noch PP-Aktivität zu messen. Die transgenen trunkierten I₂-Mäuse lagen mit 0.04±0.04 nmol/mg Protein/min wieder auf dem selben Niveau wie die I₂-full length-Mäuse.

A

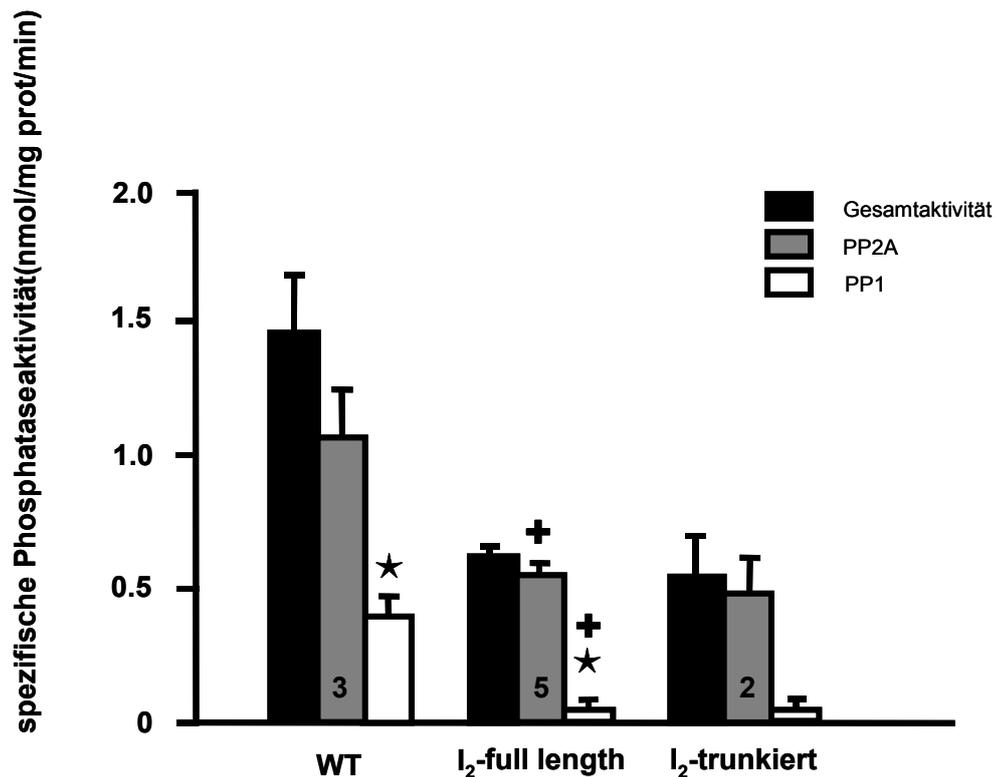


Abb. 4.13.: Phosphataseaktivität in Herzhomogenaten von WT und transgenen I₂- Mäusen (full length und trunkiert) und der Einfluss von 10 nM Okadasäure (OA)

Die Phosphataseaktivität wurde in 1 µg Herzhomogenat durch Dephosphorylierung von [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat gemessen. Die PP1-Aktivität wurde durch Zugabe von 10 nmol OA ermittelt. Die PP2A-Aktivität konnte errechnet werden als Differenz zwischen Gesamtaktivität und PP1-Aktivität.

Ordinate: Phosphataseaktivität (nmol/mg Protein/min).

Zusammengefasst war die Gesamtposphataseaktivität um 57% und die PP1-Aktivität allein um 88% erniedrigt in Herzen von transgenen I₂-full length-Mäusen. Die PP2A-Aktivität war um 45% verringert im Vergleich zu WT-Hezen. Die PP1-Aktivität macht in transgenen I₂-full length-Mäusen 8%, die PP2A-Aktivität 92% der Gesamtaktivität aus. Zum Vergleich dazu macht die PP1-Aktivität in WT-Mäusen 27% und die PP2A-Aktivität 73% der Gesamtaktivität aus (s. Abb. 4.14.).

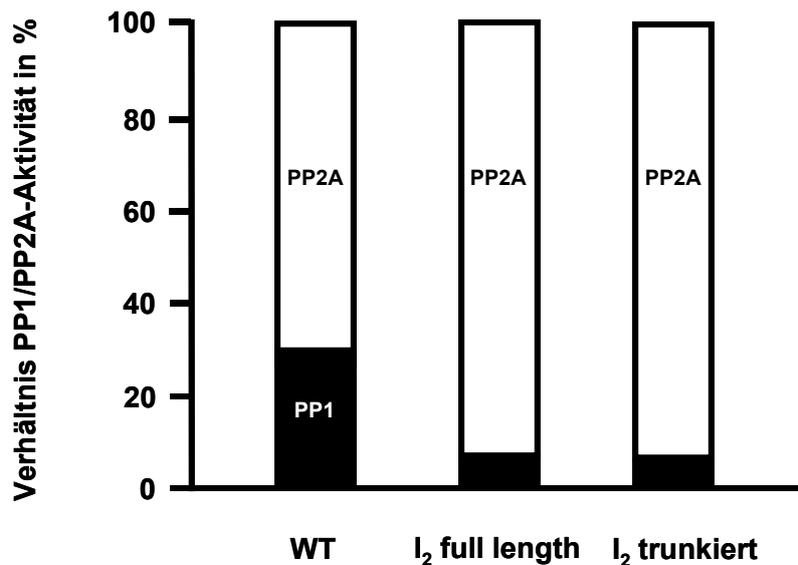


Abb. 4.14.: Anteil der PP1-Aktivität an der Gesamtphosphataseaktivität

Der Anteil der PP1-Aktivität wurde durch Division der Messwerte mit 10 nM OA durch die Messwerte ohne OA berechnet und in Prozent an der Gesamtaktivität angegeben.

4.3. Untersuchung von adenoviral mit I₂-Virus infizierten Zellen

Es wurde ein I₂-Virus generiert (Balzer 2004), um Kompensationen bei der Expression von I₂ im transgenen Mausmodell ausschließen zu können. Bei diesem transgenen Mausmodell könnte eine erhöhte Expression der PP1 und PP2A als mögliche Kompensation auftreten. Veröffentlicht wurde eine erhöhte Expression von PP1 bei einem transgenen Mausmodell, welches das trunkierte I₂-Protein überexprimiert (Kirchhefer et al. 2005). Diese erhöhte Expression von PP1 konnte auch bei I₂-full length-Mäusen festgestellt werden (s. 4.2.2.). Zusätzliche Gründe für die Generierung des I₂-Virus waren eine schnelle Überexpression des I₂, und dass andere Proteine in ihrer Expression nicht durch die Integration einer Expressionskassette in das Mausgenom beeinflusst werden. Mit dem Instrument, dem I₂-Virus, konnte eine Überexpression von I₂ auf zellulärer Ebene bei verschiedenen Zellen untersucht und mit Ergebnissen von transgenen Mäusen verglichen werden.

4.3.1. Untersuchung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Um die möglichen Kompensationen in den Untersuchungen von I₂- (trunkiert) und I₂-full length-Mäusen auszuschließen, wurden die Verhältnisse auf zellulärer Ebene untersucht, indem Kardiomyozyten in Kultur mit dem I₂-Virus infiziert wurden. In dieser Arbeit wurden neonatale Rattenkardiomyozyten untersucht.

4.3.1.1. Immunhistologie von infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die Immunhistologie wurde zur Untersuchung der Infektion und der Verteilung von I₂ in den Kardiomyozyten eingesetzt. Die auf Chamber Slides ausgesäten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden mit 1×10^7 IU des I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert (s. 3.5.9.). Dabei konnten die neonatalen Kardiomyozyten, wie alle vorher untersuchten Zellen, mit dem I₂-Virus infiziert werden. Bei diesen Zellen sollte mit einer Doppelfärbung die Verteilung des I₂ und die Identität der Zellen geprüft werden. Um die Identität zu prüfen, wurde versucht, das herzspezifische Calsequestrin (CSQ) nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden zwei primäre Antikörper, gegen I₂ und gegen CSQ, eingesetzt, welche mit verschiedenen zweiten Antikörpern detektiert wurden, d.h. Anti-mouse Ig G (Anti-I₂) und Protein-A (Anti-CSQ). Der Anti-mouse Ig G (Anti-I₂) wurde mit dem Farbstoff Cy3 und Protein-A (Anti-CSQ) mit Alexa 647 konjugiert. Somit konnte in einer Zelle I₂ und CSQ nachgewiesen werden, d.h. bei einer Zelle konnte Identität und I₂-Verteilung untersucht werden (s. Abb. 4.15. **A**, **C**).

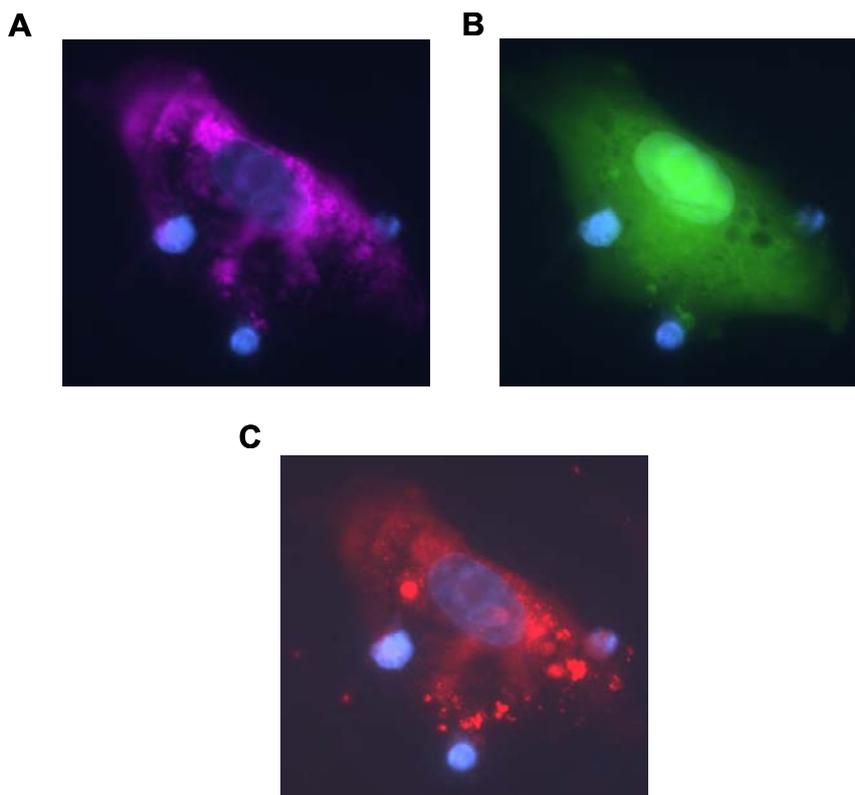


Abb. 4.15.: Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem I₂-Virus

Zellkultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Für die Immunhistologie wurden die Zellen mit 1×10^7 IU des I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert. Photographie des immunhistologischen Nachweises von CSQ (**A**), GFP (**B**) und I₂ (**C**).

In den mit I₂-Virus infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte eine homogene Verteilung des I₂ im Zytoplasma der Kardiomyozyten, wahrscheinlich assoziiert mit den kontraktilen Strukturen, gezeigt werden, ähnlich der Verteilung des CSQ.

4.3.1.2. Bestimmung der Phosphataseaktivität im Gesamtextrakt von infizierten neonatalen Kardiomyozyten

Nachdem die Proteinexpression und Verteilung von I₂ in infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten ermittelt wurde, mußte die Phosphataseaktivität in infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht werden, um zu ermitteln, ob das überexprimierte I₂ funktionell aktiv ist, d.h. einen inhibitorischen Effekt auf die PP1 hat. Deshalb wurden Homogenate von Zellen hergestellt, die entweder mit dem I₂- oder mit Ktr-Virus infiziert waren (s. 3.6.1.) und in einen PP-Assay mit [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat eingesetzt (s. 3.6.3.). In vorherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Ktr-Virus keinen Einfluss auf die PP1-/PP2A-Aktivität von H₉C₂-Zellen hat. Deshalb wurde angenommen, dass der Ktr-Virus keinen Einfluss auf die PP1-/PP2A-Aktivität von anderen Zellen wie neonatale Kardiomyozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen hat. Deswegen dienten Ktr-Virus infizierte neonatale Kardiomyozyten als Kontrollen. Wiederum wurde in diesem PP-Assay das freigesetzte [³²P]-Phosphat gemessen und dieses galt als Maß für die Phosphataseaktivität (PP-Aktivität). Die gemessene PP-Aktivität in den Homogenaten setzt sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (1 mM EDTA, Abwesenheit von zweiwertigen Kationen) aus der PP1 und der PP2A zusammen, die beide [³²P]-Phosphorylase a dephosphorylieren. Die spezifische PP-Aktivität (in einer Minute umgesetzte Phosphorylase a pro mg eingesetztes Protein [nmol/mg Protein/min]) war in Homogenaten von I₂-Virus infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 1.81±0.10 nmol/mg Protein/min um 30% geringer als die der Ktr-Virus infizierten Kardiomyozyten mit 2.60±0.15 nmol/mg Protein/min. Um nun zwischen der PP1- und der PP2A-Aktivität unterscheiden zu können, wurde der Proteinphosphatasehemmstoff Okadasäure zu allen Proben hinzugegeben. Er wurde in einer Menge von 10 nM hinzugegeben, bei der nur die PP2A-Aktivität vollständig gehemmt wurde und die PP1-Aktivität unbeeinflusst blieb. Nachdem alle Proben 10 min mit 10 nM Okadasäure inkubiert wurden, konnte die verbliebene PP1-Aktivität gemessen werden. Diese hatte bei den Ktr-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten einen Wert von 0.95±0.08 nmol/mg Protein/min, bei den I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten war mit 0.35±0.03 nmol/mg Protein/min nur noch 37% der PP1-Aktivität zu messen. Die PP2A-Aktivität, welche sich aus der Differenz aus Gesamtaktivität und der Aktivität, nach Zugabe der Okadasäure, berechnet, war bei den I₂-Virus infizierten Zellen mit 1.46±0.09 nmol/mg Protein/min nicht signifikant geringer als bei den Ktr-Virus infizierten Zellen mit einer Aktivität von 1.66±0.07 nmol/mg Protein/min.

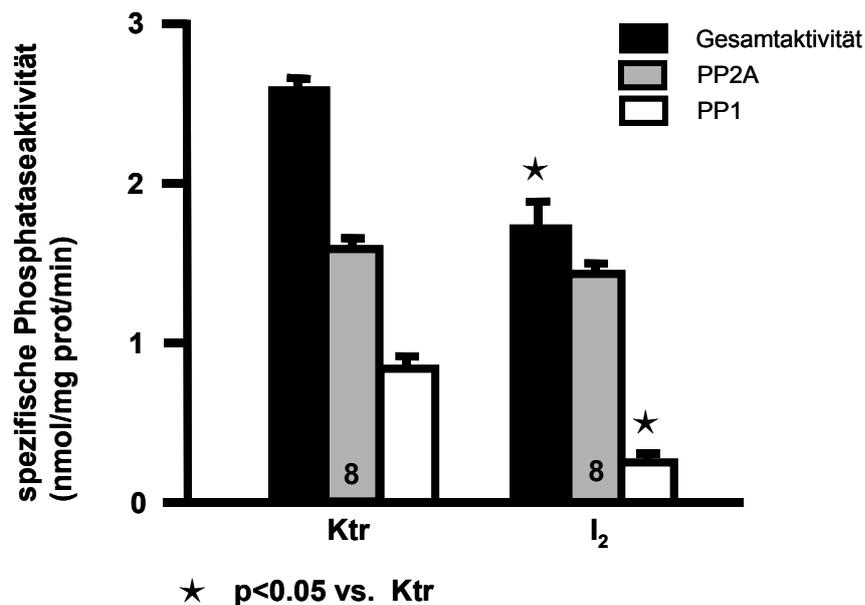


Abb. 4.16.: Phosphataseaktivität in Zellhomogenaten von infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten und der Einfluss von 10 nM Okadasäure (OA)

Neonatale Kardiomyozyten wurden mit 1×10^7 IU rekombinanten Adenoviren (Ktr. und I₂) für 72 h infiziert und dann homogenisiert. Vor der Messung wurden Teile der Homogenate, die 1 µg Protein enthielten, entweder mit 10 nM Okadasäure oder mit 1%iger DMSO-Lösung für 10 min inkubiert. Die Phosphataseaktivität in den Homogenaten wurde durch Dephosphorylierung von [³²P]-markierter Phosphorylase a als Substrat gemessen. Die PP2A-Aktivität wurde durch Zugabe und Hemmung durch 10 nM OA ermittelt (Differenz zwischen Gesamtaktivität und Aktivität nach Zugabe der OA). Ordinate: Phosphataseaktivität angegeben als spezifische Aktivität.

Zusammengefaßt war die Gesamtposphataseaktivität um 30% und die PP1-Aktivität allein um 63% erniedrigt in I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten. Die PP2A-Aktivität war um 12% geringer in I₂-Virus infizierten als in Ktr-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten. Die PP1-Aktivität macht 20% in I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten, die PP2A-Aktivität 80% der Gesamtaktivität aus. Zum Vergleich dazu macht die PP1-Aktivität 36% in Ktr-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten und die PP2A-Aktivität 64% der Gesamtaktivität aus (s. Abb. 4.17.).

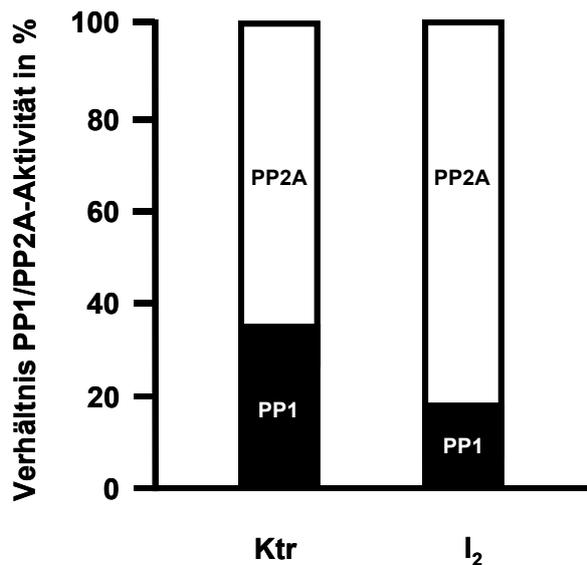


Abb. 4.17.: Anteil der PP1-Aktivität an der Gesamtphosphataseaktivität

Der Anteil der PP1-Aktivität wurde durch Subtraktion der Messwerte mit 10 nM OA von den Messwerten ohne OA berechnet und in Prozent der Gesamtaktivität angegeben.

4.3.1.3. Calcium (Ca^{2+})-Transientenmessung an adenoviral infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten

Um die Auswirkungen einer I_2 -Überexpression zu untersuchen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in mehreren unabhängigen Präparationen isoliert und jeweils für 72 h mit den beiden Adenoviren infiziert (1×10^7 IU). Die Vitalität der Zellen wurde durch Steigerung der elektrischen Stimulationsfrequenz (1.0 bzw. 1.5 Hz) überprüft. Zur Ca^{2+} -Transientenmessungen wurden die infizierten neonatale Kardiomyozyten mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff inkubiert (Indo-1/AM, s. 3.7.), der mit einer Wellenlänge von 365 nm angeregt wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff emittierte in der Ca^{2+} -freien Form mit einer Wellenlänge von 405 nm. Das Emissionsmaximum lag nach Ca^{2+} -Bindung bei 495 nm. Als Maß für die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde der Quotient der Emissionen 405/495 nm (Ratio) verwendet.

Es bestand die Befürchtung, dass das in beiden Viren (I_2 und Ktr) als Reporter gen einklonierte, grünfluoreszierende Protein (GFP) die Ca^{2+} -Transientenmessung durch Autofluoreszenz stören könnte. Deshalb wurden nicht infizierte neonatale Kardiomyozyten (NI) als Kontrolle gemessen. Jedoch zeigten diese Untersuchungen, dass GFP keinen störenden Einfluss auf die Ca^{2+} -Transientenmessungen hatte, da keine Unterschiede zwischen nicht infizierten und Ktr-Virus infizierten neonatale Kardiomyozyten zu messen waren.

Die eigentlichen Transientenmessungen fanden bei einer Frequenz von 0.5 Hz statt. 25 einzelne Transienten pro Zelle und Messung wurden ausgewertet und gemittelt. Daraus

wurden die maximale Amplitudenhöhe (Δ : Differenz zwischen der diastolischen und systolischen Ca^{2+} -Konzentration), die Zeit, in der das zytosolische Ca^{2+} um 50% ($t_{50\%}$) abfiel, sowie die diastolische und systolische Ca^{2+} -Konzentration ($\text{Ratio}_{\text{diastolisch/systolisch}}$) ausgerechnet. Pro Untersuchungsgruppe wurden 13-19 Messungen ausgewertet.

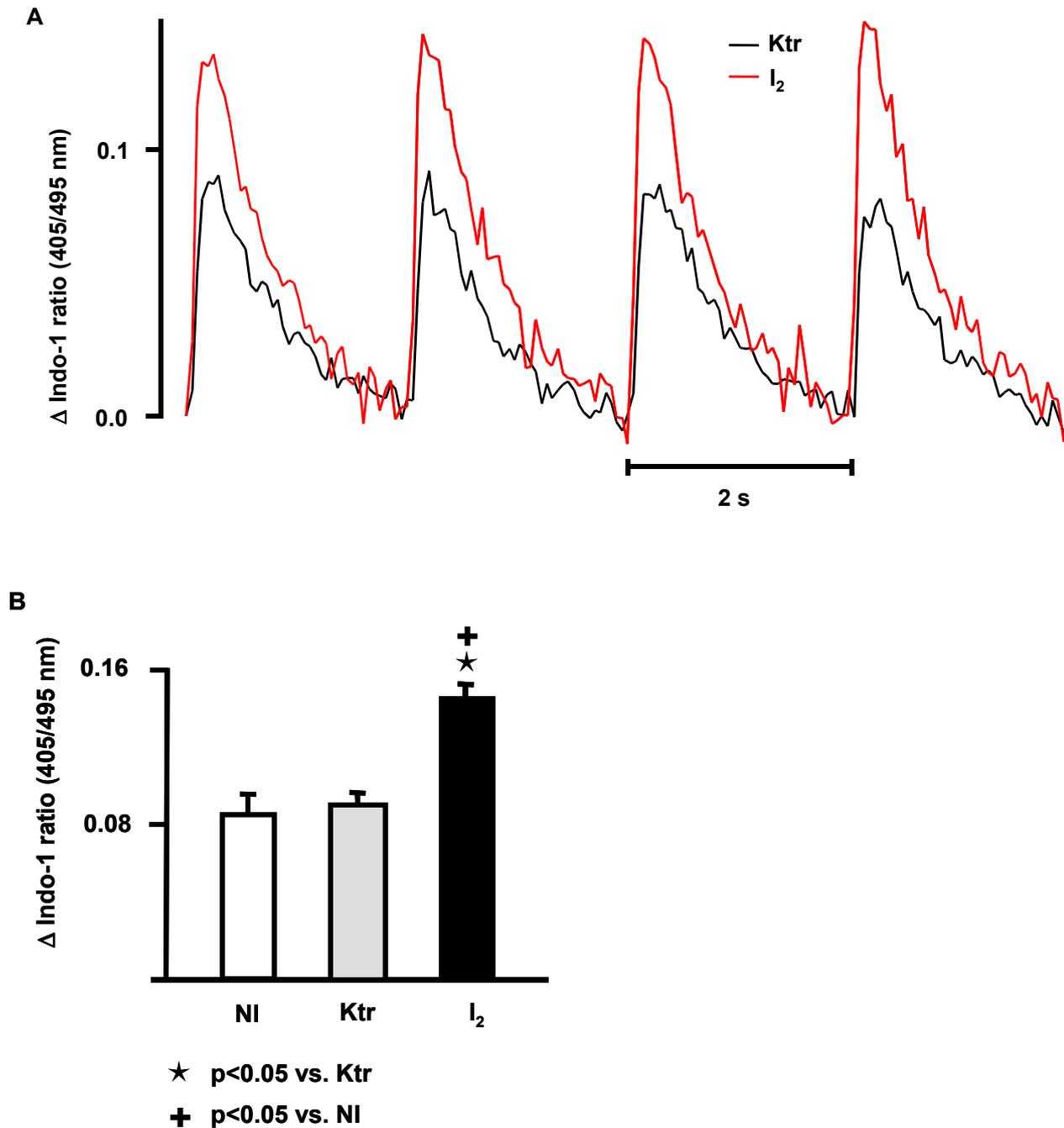


Abb. 4.18.: Ca²⁺-Messungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten

(A) Dargestellt sind Ca²⁺-Transienten von isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 inkubiert, bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und mit einer Frequenz von 0.5 Hz stimuliert. Die rote Linie zeigt die Ca²⁺-Transienten der I₂-, die schwarze die der Ktr-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten. (B) Dargestellt ist ein Diagramm der verschiedenen Ca²⁺-Amplituden in nicht (NI), Ktr- und I₂-Adenovirus infizierten neonatalen Kardiomyozyten. Die Ca²⁺-Amplituden berechnen sich aus der Differenz von systolischem Ca²⁺- und diastolischem Ca²⁺-Gehalt der Zelle.

Dabei fiel auf, dass nur die Ca^{2+} -Amplitude der mit dem I_2 -Virus infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gegenüber den nicht und den mit dem Ktr-Virus infizierten Zellen signifikant erhöht war. Alle anderen gemessenen Werte waren zwar nicht signifikant verändert, jedoch waren einige Werte der I_2 -Virus infizierten Zellen erhöht gegenüber den Kontrollgruppen, z.B. das systolische Ca^{2+} und die Zeit bis zum 50%-igem Ca^{2+} -Abfall. Die Zahlenwerte sind in der Tabelle 4.2. dargestellt.

	nicht infiziert (NI) Mittelwert \pm Standardfehler	Kontroll-Virus (Ktr) Mittelwert \pm Standardfehler	I_2-Virus (I_2) Mittelwert \pm Standardfehler
n = Präparationen/ Zellen	2/13	3/16	3/19
Diastolisches Ca^{2+}	2.91 \pm 0.08	2.96 \pm 0.07	3.02 \pm 0.05
Systolisches Ca^{2+}	3.01 \pm 0.08	3.06 \pm 0.07	3.18 \pm 0.05
Ca^{2+}-Amplitude	0.09 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01 ★ +
Ca^{2+}-Abfall (ms)	467 \pm 38	464 \pm 24	495 \pm 28
Zelldurchmesser (μm)	54 \pm 3	51 \pm 2	55 \pm 2

★ **p<0.05 vs. NI**

+ **p<0.05 vs. Ktr**

Tabelle 4.2.: Ca^{2+} -Messung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Tabellarische Darstellung der Ca^{2+} -Messungen von nicht infizierten, Ktr-Virus infizierten und I_2 -Virus infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten.

4.3.2. Untersuchung von adulten Rattenkardiomyozyten

Um mögliche Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten ausschließen zu können, wurden die beiden Adenoviren, I_2 - und Ktr-Virus, an adulten Rattenkardiomyozyten getestet. Die Isolation, Kultivierung und Infektion wurde von der Arbeitsgruppe Schlüter in Gießen durchgeführt, die Expression auf Proteinebene wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Western Blot untersucht (s. 3.5.1.ff).

Expression des I₂ in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Die adulten Rattenkardiomyozyten wurden von der Arbeitsgruppe Schlüter in Gießen nach ihren Protokollen isoliert und kultiviert. Infiziert wurden die adulten Rattenkardiomyozyten, in 6-well-plates, mit zwei verschiedenen Virusmengen (2.5×10^7 IU und 5×10^7 IU). Als Kontrolle dienten adulte Rattenkardiomyozyten, die mit dem Ktr-Virus infiziert wurden. Die infizierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden nach 24 h und 48 h geerntet (s. 3.5.1.). Die Expression auf Proteinebene wurde mittels Western Blot (s. 3.5.1.ff) untersucht, mit dem Ergebnis, dass bei den infizierten adulten Rattenkardiomyozyten das exprimierte I₂ nachgewiesen werden konnte. Dabei fiel auf, dass erst bei einer Virusmenge von 2.5×10^7 IU nach 48 h ein Signal detektiert werden konnte, jedoch bei der doppelten Virusmenge schon nach 24 h. Bei den Ktr-Virus infizierten Kardiomyozyten war kein I₂ nachweisbar (s. Abb. 4.19.).

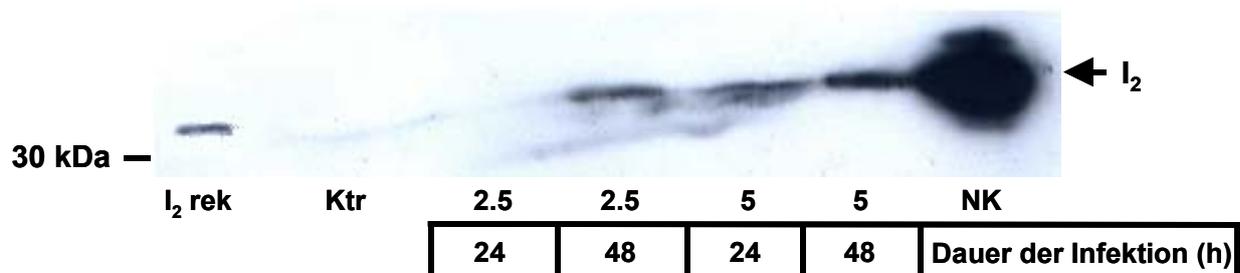


Abb. 4.19.: Expression von I₂ in I₂-Virus infizierten adulten Rattenkardiomyozyten

Die isolierten adulten Rattenkardiomyozyten wurden mit den beiden Adenoviren Ktr-Virus (**Ktr**) und I₂-Virus infiziert. Dabei wurden 2.5 und 5×10^7 IU des I₂-Virus zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden nach 24 h oder 48 h geerntet. Die Zellen wurden homogenisiert und I₂ mittels Western Blot nachgewiesen. Als Positivkontrolle dienten rekombinantes I₂ (**I₂ rek**) und I₂-Virus infizierte neonatale Rattenkardiomyozyten (**NK**).

4.4. Generierung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression der strukturellen Untereinheit der PP2A

Um die Auswirkungen einer Überexpression der PP2A und seiner Untereinheiten auf das kardiovaskuläre System untersuchen zu können, wurden transgene Mäuse generiert. Zunächst sollte bei den Tieren eine Überexpression der strukturellen Untereinheit (PP2A_{Aα}) der PP2A in der Herzmuskulatur erreicht werden.

4.4.1. Klonierung der Expressionskassette

Zu diesem Zweck wurde eine Expressionskassette kloniert, in der die kodierende Sequenz der PP2A_{Aα} des Menschen unter Kontrolle des α-MHC-Promotors stand (s. Abb. 4.20. **B**). Die PP2A_{Aα}-Sequenz wurde durch PCR wie unter 3.3.7. beschrieben aus dem Plasmid pCR2.1::PP2A_{Aα} amplifiziert und das Produkt aus einem Agarosegel extrahiert (s. Abb. 4.20. **A**). Der forward- und der reverse-Primer wurde mit einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuclease *Kpn* I versehen. Der α-MHC-Vektor wurde nach einem *Kpn* I-Restriktionsverdau noch mit einer alkalischen Phosphatase (CIP) aus Kälberdarm inkubiert, um die Phosphatgruppen am Ende zu entfernen. Somit sollte es zu keiner Religation des α-MHC-Vektors kommen. Danach konnte nach einem *Kpn* I-Restriktionsverdau der PP2A_{Aα}-Sequenz direkt eine Ligation mit dem α-MHC-Vektor durchgeführt werden. Diese DNA wurde in *E. coli* transformiert und die in den *E. coli*-Klonen amplifizierte Plasmid-DNA mittels Restriktion überprüft. Zur Kontrolle wurde eine Religation des α-MHC-Vektors durchgeführt und auch in *E. coli* transformiert. Es entstanden keine *E. coli*-Klone, so dass eine Religation des α-MHC-Vektors ausgeschlossen wurde. Die entstandene Plasmid-DNA wurde zuerst mit der Restriktionsendonuclease *Kpn* I untersucht, ob eine Integration der PP2A_{Aα}-Sequenz stattgefunden hat (s. Abb. 4.20. **C**), indem das Insert von 2.2 kb wieder herausgeschnitten wurde. Bei *E. coli*-Klonen, welche die PP2A_{Aα}-Sequenz eingebaut hatten, konnte man im Agarosegel ein ~2.2 (PP2A_{Aα}) und ~8.9 kb großes DNA-Fragment unterscheiden. Danach wurde mit der Restriktionsendonuclease *Sca* I die Orientierung der PP2A_{Aα}-Sequenz in der Plasmid-DNA ermittelt (s. Abb. 4.20. **D**). Die Schnittstellen für *Sca* I sind auf dem neu generierten Vektor so lokalisiert, dass je nach Orientierung der Integration von PP2A_{Aα} unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen sollten. In der 5'-3'-Orientierung (Sense) waren ein 7.9 kb und ein 2.9 kb großes DNA-Fragment, in der 3'-5'-Orientierung (Antisense) waren ein 8.6 kb und ein 2.2 kb großes DNA-Fragment zu erwarten. In diesem Fall sind beide Orientierungen gefunden und mit einer Auftragssequenzierung bei GATC bestätigt worden. Die „Sense“ Orientierung wurde bei Klon 2, die „Antisense“-Orientierung bei Klon 3 gefunden. Abschließend wurde die Expressionskassette durch einen Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuclease *Nru* I auf Vollständigkeit überprüft. Erwartet wurden DNA-Fragmente mit der Größe von 8.4 kb und 2.7 kb. Das 8.4 kb große Fragment bestand aus dem α-MHC-Vektor und dem Insert PP2A_{Aα}, das 2.7 kb große Fragment enthielt die

restlichen prokaryotischen Sequenzen aus dem α -MHC-Vektor. Nach erfolgreicher Überprüfung wurde die Expressionskassette in befruchtete Eizellen zur Integration in das Mausgenom mikroinjiziert (s. 3.4.7.1.). Aus einem Injektionszyklus gingen insgesamt 30 Jungtiere hervor, 10 PP2A_{A α} -Sense-Tiere und 20 PP2A_{A α} -Antisense-Tiere. Untersuchungen an diesen Tieren, wie Genotypisierung und Untersuchung von Proteinexpressionen, konnten nicht im Rahmen dieser Arbeit geschehen, sondern werden im Arbeitskreis von Prof. Neumann an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg fortgeführt.

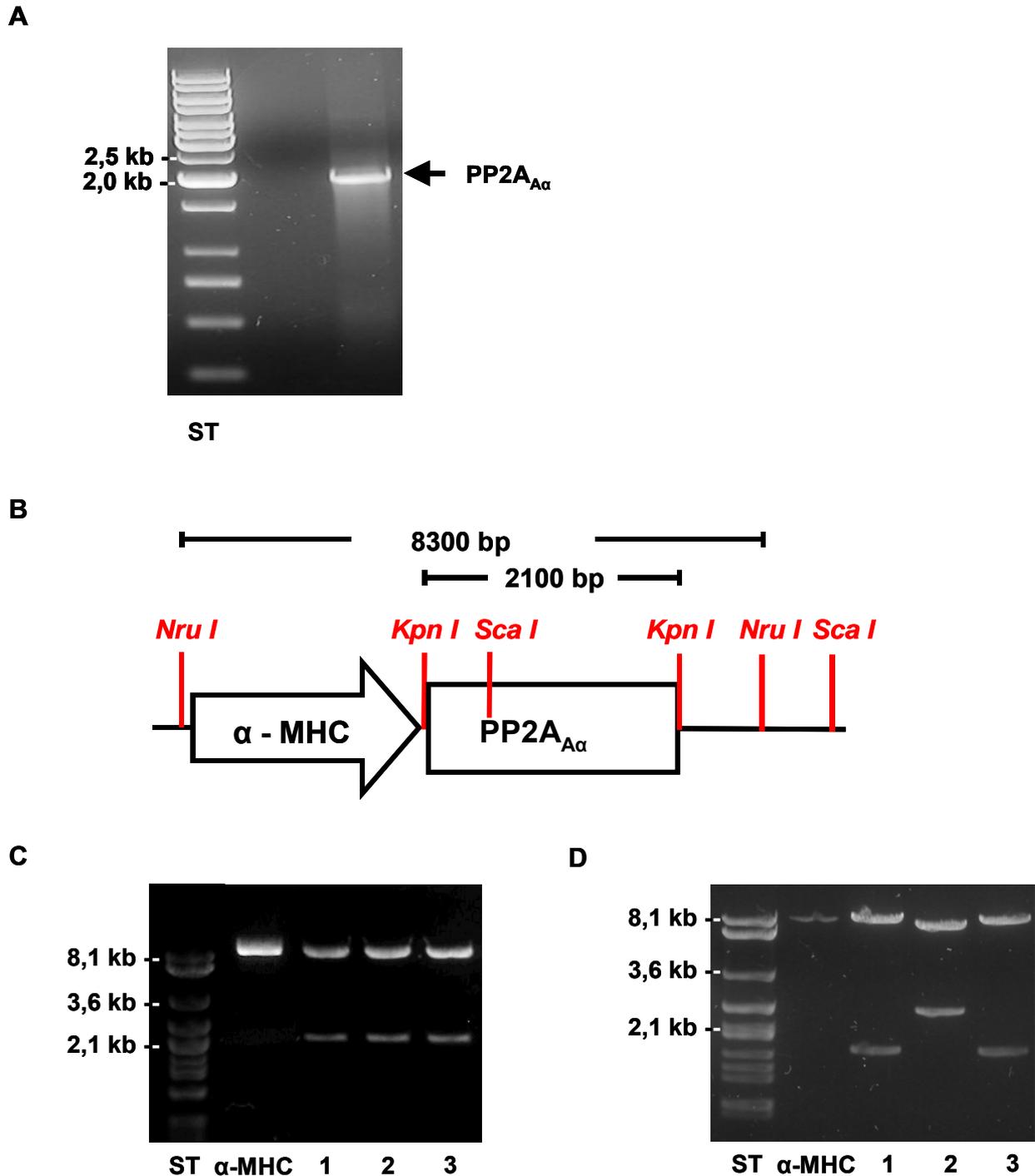


Abb. 4.20.: Klonierung der Expressionskassette α -MHC-PP2A_{Aα} für die Herstellung von transgenen Mäusen

(A) Photographie eines Agarosegels auf dem die durch PCR amplifizierte PP2A_{Aα}-Sequenz aufgetragen wurde. (B) Schematische Darstellung des α -MHC-PP2A_{Aα}-Konstruktes (C) Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA der verschiedenen *E. coli*-Klone (1-3) und des α -MHC-Vektors mit der Restriktionsendonuclease *Kpn* I. (D) Der Restriktionverdau von Plasmid-DNA der verschiedenen *E. coli*-Klone (1-3) und des α -MHC-Vektors mit der Restriktionsendonuclease *Sca* I. Mit diesem Restriktionsverdau wurde die Orientierung der PP2A_{Aα}-Sequenz in der Plasmid-DNA überprüft.

ST: DNA-Größenstandard λ Eco 47 I.

4.5. Generierung transgener Mäuse zur glattemuskelspezifischen Überexpression des Inhibitors 2

Der Tonus von glatten Muskelzellen im Gefäßsystem beeinflusst viele Parameter im kardiovaskulären System. Die Wichtigsten sind der Durchmesser der Gefäße und der daraus resultierende, periphere Widerstand und der Blutdruck. Ein erhöhter peripherer Widerstand, ausgelöst durch einen erhöhten Tonus der glatten Muskulatur, stellt eine Herzbelastung dar, die in einer Herzinsuffizienz enden kann, aber nicht zwangsläufig enden muss. Da Phosphorylierungen des Myosins (MLC₂₀) den Tonus der glatten Muskelzellen beeinflussen, war die Bedeutung der PP1 in der glatten Muskulatur der Gefäße von Interesse. Untersuchungen haben gezeigt, dass transgene PP1_{Cα}-Mäuse, welche die PP1_{Cα}-Sequenz unter Kontrolle des SM22-Promotors stabil in das Genom integriert hatten, keine Überexpression von PP1_{Cα} auf Proteinebene zeigten (Balzer 2004). Somit wurden Mäuse generiert, welche den Inhibitor 2 der PP1_{Cα} überexprimierten.

4.5.1. Klonierung der Expressionskassette

Zuerst wurde eine Expressionskassette kloniert, welche die I₂-Sequenz unter der Kontrolle des SM-MHC-Promotor enthielt (s. Abb. 4.21.). Die I₂-Sequenz wurde aus einem bereits bestehenden Plasmid, dem pAd-Track-I₂, mit den beiden Restriktionsendonucleasen *Bgl* II und *Not* I herausgeschnitten (s. 3.4.5.1.) und die überhängenden Sequenzen mit dem Klenow-Fragment geglättet (s. 3.3.6.3.). Der SM-MHC-Vektor wurde mit der Restriktionsendonuclease *Xba* I linearisiert und die Schnittstellen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Danach wurde die I₂-Sequenz mit dem SM-MHC-Vektor ligiert und in *E. coli* Bakterien transformiert. Die durch die verschiedenen *E. coli*-Klone amplifizierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktion überprüft. Zuerst erfolgte eine Restriktion mit der Restriktionsendonuclease *Hind* III, um zu untersuchen, ob eine Integration der I₂-Sequenz stattgefunden hatte, da *Hind* III jeweils nur eine Schnittstelle im SM-MHC-Vektor und in der I₂-Sequenz hat und somit nur bei Integration der I₂-Sequenz zwei DNA-Fragmente entstehen konnten (s. Abb. 4.21. **A**). Der zweite Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuclease *Sal* I ermittelte die Orientierung der I₂-Sequenz. Die Schnittstellen *Sal* I sind auf dem neu generierten Vektor so lokalisiert, dass je nach Orientierung der Integration von I₂ unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen sollten. In der 5'-3'-Orientierung (Sense) war ein 5.1 kb und ein 2.4 kb großes DNA-Fragment, in der 3'-5'-Orientierung (Antisense) ein 4.4 kb und ein 3.1 kb großes DNA-Fragment zu erwarten (s. Abb. 4.21. **A**). Die klonierte 3.1 kb große Expressionskassette wurde mit den beiden Restriktionsendonucleasen *Sph* I und *Sca* I herausgeschnitten und durch Auftragssequenzierung bei GATC überprüft.

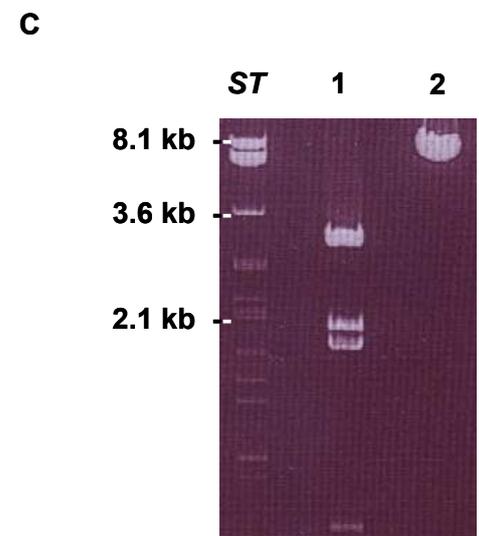
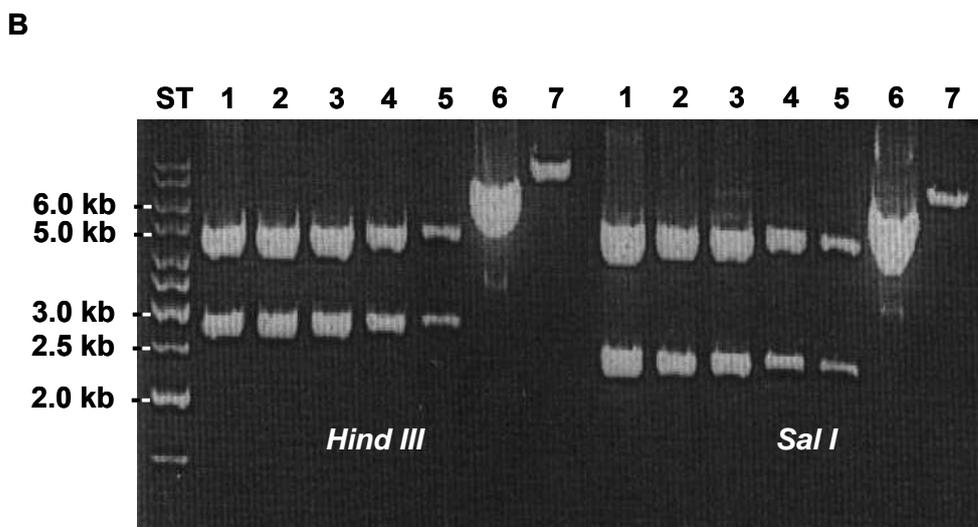
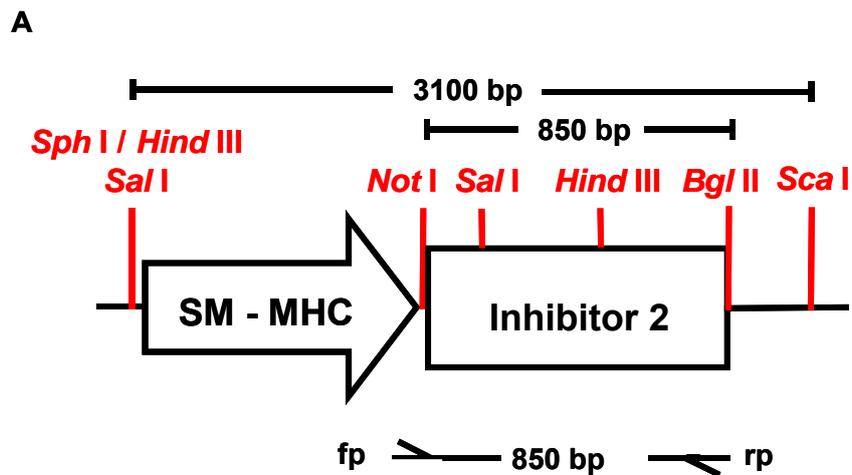


Abb. 4.21.: Klonierung der Expressionskassette SM-MHC-I₂

(A) Schematische Darstellung des SM-MHC-I₂-Konstruktes. (B) Dargestellt ist die Photographie eines Agarosegels, auf dem zwei verschiedene Restriktionsfragmente (*Hind III* und *Sal I*) verschiedener *E. coli*-Klone (1-5) zu sehen sind. Zur Kontrolle wurde linearisierter SM-MHC-Vektor (6) und linearisiertes pAd-Track-I₂ (7) aufgetragen. ST: 1 kb DNA-Größenstandard

(C) Die Expressionskassette (3.1 kb = SM-MHC-Promotor + I₂-Sequenz) wurde aus dem klonierten Plasmid (1) durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonucleasen *Sph I* und *Sca I* herausgeschnitten. Als Kontrolle ist das linearisierte Plasmid (2) mit aufgetragen.

ST: DNA-Größenstandard λ Eco 47 I.

Nach erfolgreicher Überprüfung wurde die Fremd-DNA durch Mikroinjektion der Expressionskassette in befruchtete Eizellen zwecks Integration in das Mausgenom gebracht (s. 3.4.9.1.). Aus einem Injektionszyklus gingen insgesamt 7 Jungtiere hervor, welche wie unter 3.4.10. beschrieben genotypisiert wurden. Das per PCR amplifizierte DNA-Fragment umfasst 850 Basenpaare. Die erste Untersuchung der 7 Jungtiere mittels PCR (s. Abb. 4.22.) zeigte, dass Maus 4 und 7 die injizierte Expressionskassette in ihr Genom integriert hatten.

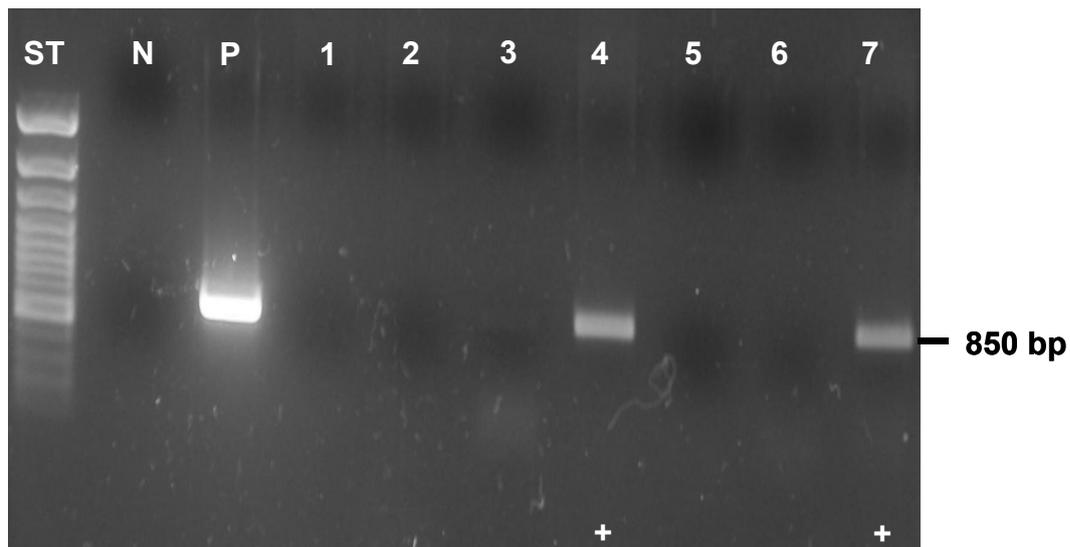


Abb. 4.22.: Genotypisierung der SM-MHC-I₂-Mauslinie

Photographie eines Agarosegels, angefärbt mit Ethidiumbromid, auf dem DNA-Stücke aus einer PCR aufgetragen sind. DNA aus der Schwanzspitze wurde mittels PCR untersucht, ob die Expressionskassette (SM-MHC-I₂) vorhanden war. **P**: Positivkontrolle **N**: Negativkontrolle **ST**: 1 kb DNA-Größenstandard.

Nachdem zwei transgene SM-MHC-I₂-Mäuse mittels PCR identifiziert wurden, mußte bei deren Nachkommen die Proteinexpression von I₂ in der glatten Muskulatur untersucht werden. Jedoch zeigten Western Blot-Analysen, dass es in keiner der beiden Mauslinien zu einer I₂-Überexpression in der glatten Muskulatur kam.

4.6. Untersuchung von adenoviral mit I₂-Virus infizierten Zellen

4.6.1. Untersuchung von A₇R₅-Zellen

Zuerst wurde an einer Zelllinie (A₇R₅), die aus embryonalen glatten Muskelzellen hervorgegangen ist, geprüft, ob glatte Muskelzellen oder artverwandte Zellen infizierbar

waren und I₂ überexprimierten. Der Infektionsverlauf konnte durch Beobachtung der GFP-Fluoreszenz untersucht werden, die Proteinexpression wurde durch Western Blot-Analyse und Immunhistologie ermittelt.

Expression des I₂ in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Zur Untersuchung der Proteinexpression von I₂ wurden A₇R₅-Zellen mit steigenden I₂-Virusmengen für 72 Stunden infiziert. Mit steigenden Virusmengen konnte eine Zunahme der grünen Fluoreszenz (GFP-Expression) beobachtet werden (s. Abb. 4.23. **B**), die als Maß der Infektion galt. Als Kontrolle kultivierte nicht infizierte Zellen (NI) zeigten, wie erwartet, keine Fluoreszenz (ohne Abb.). I₂ konnte in Zellhomogenaten mittels Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1-144 des humanen I₂ gerichtet ist, bei den I₂-Virus infizierten Zellen auf einer Höhe von 31 kDa nachgewiesen werden. Mit steigender Virusmenge erhöhte sich auch die I₂-Expression in den infizierten A₇R₅-Zellen (s. Abb. 4.23. **A**).

Immunhistologie von infizierten A₇R₅-Zellen

Um die Proteinexpression und die Verteilung von I₂ in infizierten A₇R₅-Zellen zu ermitteln, wurde eine Immunhistologie durchgeführt. A₇R₅-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70% mit 1×10^7 IU des Ad-I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert (s. 3.4.9.). Das exprimierte I₂ wurde mit dem monoklonalen Antikörper gegen das humane I₂ in der Zelle sichtbar gemacht. Dabei fiel auf, dass GFP im Zytoplasma und in den Kernen, I₂ jedoch nur im Zytoplasma aber nicht in den Kernen exprimiert wurde (s. 4.18. **B, C**).

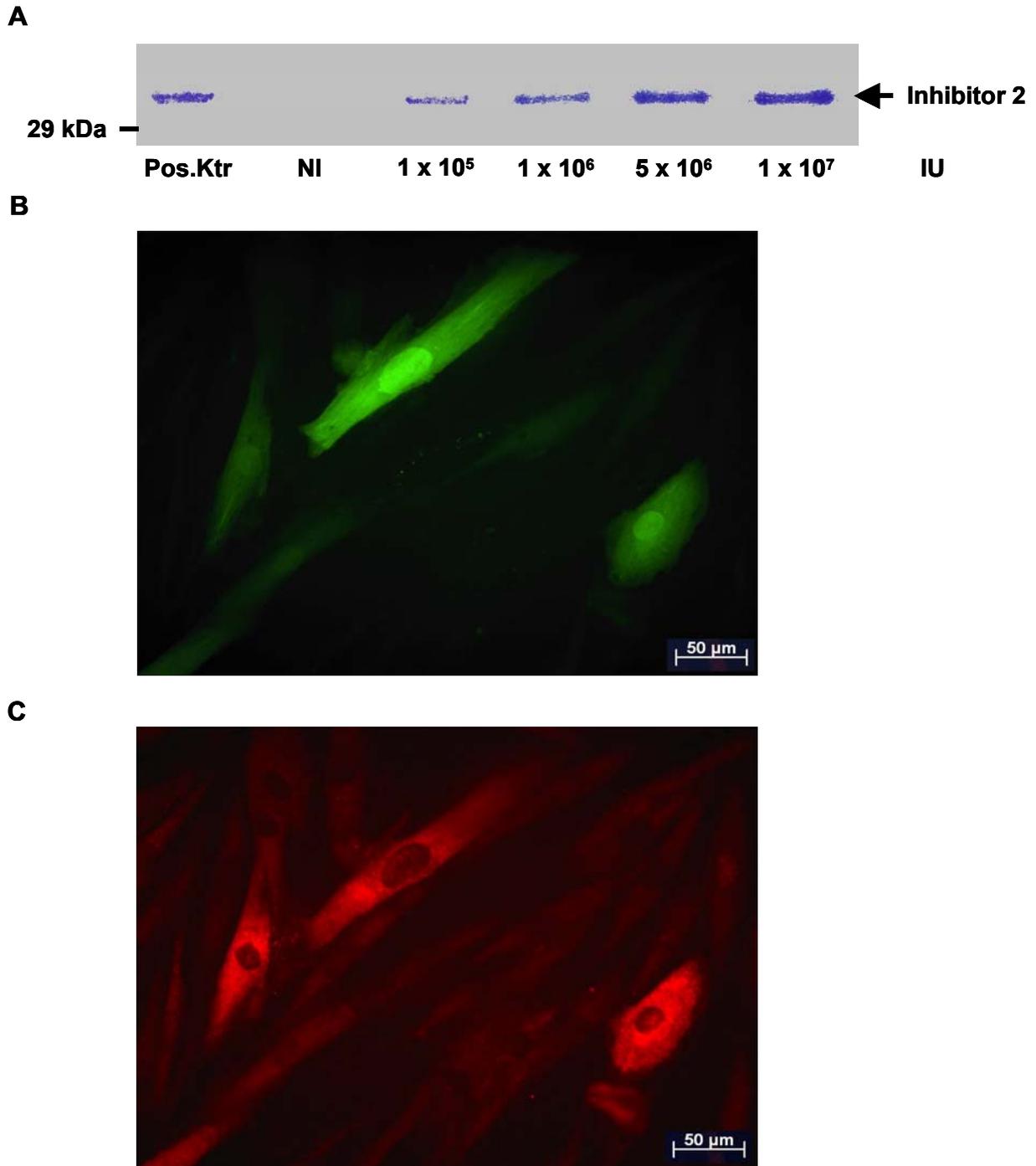


Abb. 4.23.: Infektion von A₇R₅-Zellen mit I₂-Virus

A₇R₅-Zellen wurden mit 1×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7 IU (infektiöse Einheiten) des I₂-Virus für 72 h infiziert, geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 50 μg Gesamtprotein geladen. Photographie der Nitrozellulosemembran des immunologischen Nachweises von I₂ (**A**).

Die Zellen wurden mit 1×10^7 IU des I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert. Dargestellt ist die GFP-Fluoreszenz (**B**) und der immunhistologische Nachweis von I₂ (**C**). Grün ist die Autofluoreszenz von GFP unter UV-Licht, rot ist I₂, nachgewiesen mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes I₂.

4.6.2. Untersuchung von vaskulären glatten Muskelzellen (SMC)

Der nächste Schritt war die Isolation und Infektion von Primärzellen und deren Untersuchung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vaskuläre glatte Muskelzellen (SMCs = smooth muscle cell), die per Aussprosstechnik aus Rattenaorta isoliert wurden (s. 3.2.4.), untersucht, da sie den Zellen der Gefäße mehr ähneln als z.B. die A₇R₅-Zellen. Wiederum wurde die Expression von I₂ und verschiedener zelltypischer Proteine sowie die Verteilung von I₂ in der glatten Muskelzelle untersucht.

Charakterisierung von glatten Muskelzellen der Rattenaorta durch den Nachweis von glattmuskelspezifischem Aktin

Zuerst wurde die Identität der Zellen überprüft, indem ein glattmuskelspezifisches Protein in SMC-Zellen nachgewiesen wurde. Dieser Nachweis kann mittels Western Blot über ein Homogenat von Zellen oder mittels Immunhistologie mit einer fixierten Kultur von Zellen erfolgen. Es wurde hier ein Nachweis über die Immunhistologie (s. 3.5.9.) geführt. Dazu wurde ein Antikörper gegen das glattmuskelspezifische Aktin (smooth muscle actin) verwendet. In der Abbildung 4.24. färbt sich das nachgewiesene glattmuskelspezifische Aktin violett. Folglich handelte es sich um vaskuläre glatte Muskelzellen.

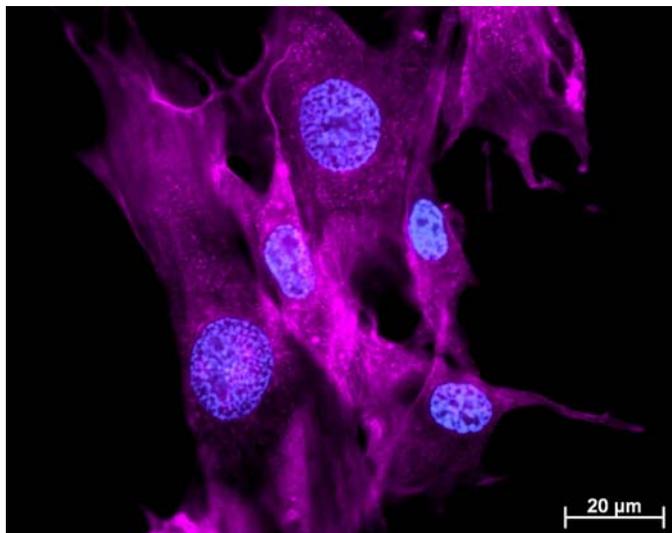


Abb. 4.24.: Charakterisierung von glatten Muskelzellen aus Rattenaorta durch den Nachweis von glattmuskelspezifischem Aktin

In primären glatten Muskelzellen (2. Passage) wurde das glattmuskelspezifische Aktin (SMA = smooth muscle actin) nachgewiesen. SMA färbte sich violett.

Expression des I₂ in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Zur Untersuchung der Proteinexpression von I₂ wurden SMC der 2.-5. Passage mit steigenden Virusmengen an I₂- oder Ktr-Virus für 72 Stunden infiziert. Es wurden nur die SMC der 2.–5. Passage untersucht, da sie ab der 6. Passage ihre Ähnlichkeit zu den glatten Muskelzellen der Gefäße verloren. Wiederum konnte mit steigenden Virusmengen bei beiden Gruppen eine Zunahme der grünen Fluoreszenz (GFP) beobachtet werden, welche als Maß der Infektion galt. Als Kontrolle wurden Ktr-Virus infizierte Zellen (Ktr) benutzt. Mit steigender Virusmenge erhöhte sich auch die I₂-Expression in den infizierten SMC (s. Abb. 4.25. **A**) genauso wie bei den A₇R₅-Zellen (s. Abb. 4.23. **A**).

Immunhistologie von infizierten SMC

Nachdem die Verteilung des exprimierten I₂ bei A₇R₅-Zellen untersucht wurde, war die Verteilung des I₂ auch bei den infizierten SMC von Interesse. Die SMC wurden bei einer Konfluenz von 70% mit 1×10^7 IU des I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert (s. 3.5.9.). Dabei konnten die Primärzellen infiziert werden, und die infizierten SMC exprimierten GFP und I₂ analog zu den A₇R₅-Zellen. In den SMC wurde GFP sowohl im Zytoplasma als auch im Kern (s. Abb. 4.25. **B**), I₂ nur im Zytoplasma nachgewiesen (s. Abb. 4.25. **C, D**).

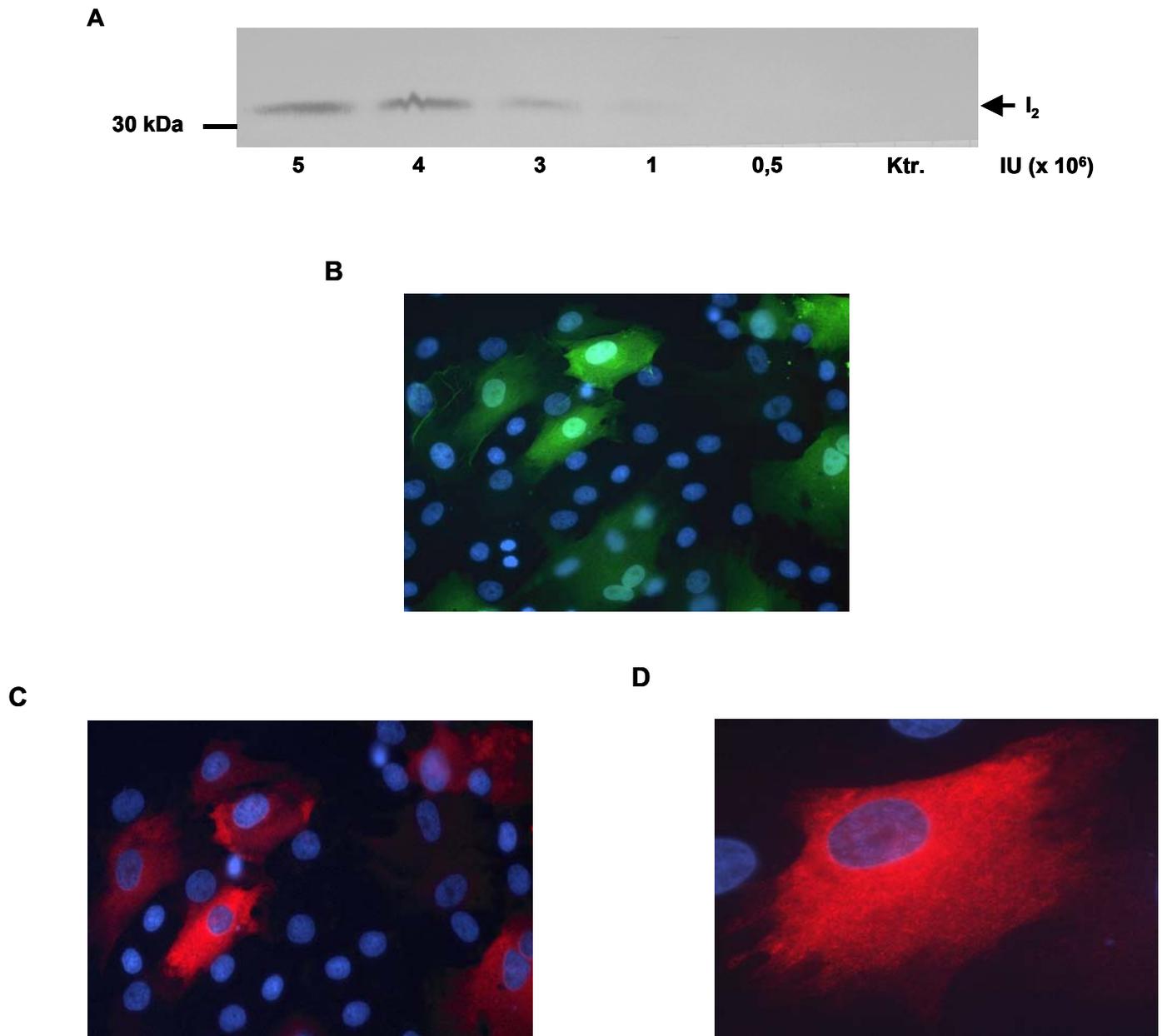


Abb. 4.25.: Infektion von SMC-Zellen mit I₂-Virus

(A) Die SMC-Zellen wurden mit I₂-Adenovirus für 72 h und mit 0,5 x, 1 x, 3 x, 4 x und 5 x 10⁶ infektiösen Einheiten (IU) infiziert, geerntet und homogenisiert. Je Spur wurden 50 µg Gesamtprotein geladen. Photographie des immunologischen Nachweises des I₂. Als Kontrolle (Ktr) dienten Ktr-Virus infizierte Zellen. Für die Immunhistologie wurden die Zellen mit 1 x 10⁷ IU des I₂-Virus für 72 h infiziert und mit 4% Formalin fixiert. Photographie der GFP-Fluoreszenz (B) und des immunhistologischen Nachweises von I₂ (C, D). In B und C wurde eine 20-fache, in D wurde eine 63-fache Vergrößerung benutzt.

5. Diskussion

Ein wichtiger regulatorischer Mechanismus für zahlreiche zelluläre Prozesse ist die reversible Phosphorylierung von Proteinen, welche durch Proteinkinasen erhöht und durch Proteinphosphatasen rückgängig gemacht wird. Zunächst waren Proteinkinasen Ziel der Untersuchungen, da in der Vergangenheit angenommen wurde, dass nur sie reguliert werden. Inzwischen wurden auch Inhibitoren der Proteinphosphatasen gefunden. Die Existenz dieser Inhibitoren weist auf die Möglichkeit hin, dass Proteinphosphatasen reguliert werden können. Somit spielen auch Proteinphosphatasen eine wichtige Rolle für den Phosphorylierungszustand von Proteinen (Janssens und Goris 2001).

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind für die Regulation der Herzkontraktion von Bedeutung. Daher wurde angenommen, dass Proteinphosphatasen auch bei der Entstehung kardialer Erkrankungen eine Rolle spielen. Diese Hypothese wurde von Untersuchungen bestätigt, welche in humanen Herzproben (Neumann et al. 1997) und in denen anderer Spezies wie z.B. Hund (Gupta et al. 2003) mit terminaler Herzinsuffizienz eine erhöhte PP1-Aktivität und Expression nachwies.

Die funktionelle Bedeutung der Phosphatasen im kardialen System wurde *in vitro* mit Hilfe exogener Phosphatase-Hemmstoffe untersucht. Dabei wurden exogene Hemmstoffe wie z.B. Okadasäure benutzt, welche außerdem eine Differenzierung zwischen PP1- und PP2A-Aktivität erlaubt. Bei den Untersuchungen zeigte sich eine vermehrte Phospholambanphosphorylierung in isolierten Meerschweinchenkardiomyozyten, die durch Hemmung der PP1- und PP2A-Aktivität durch Zugabe von 30 μM Okadasäure entstand (Neumann et al. 1993). In anderen funktionellen *in vivo* Untersuchungen wurde in isolierten humanen Herzpräparaten nach Zugabe von Okadasäure ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} nachgewiesen (Boknik et al. 2001, Lee et al. 1991).

Endogene Inhibitoren der PP1 sind seit langem bekannt. Die PP1 wird *in vivo* von mehreren endogenen Inhibitoren wie z.B. dem Inhibitor 1 (I_1), dem Inhibitor 2 (I_2), dem Dopamin- und cAMP-regulierten Phosphoprotein-32 (DARPP-32) und dem nukleären Inhibitor der PP1 (NIPP-1) reguliert. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Hemmung der PP1 in isolierten humanen Kardiomyozyten aus insuffizienten Herzen mit Hilfe einer adenoviralen Überexpression von I_1 zu einer deutlich stärkeren Zellverkürzung und höheren Ca^{2+} -Transienten nach β -adrenerger Stimulation führt (Carr et al. 2002).

Weiter wurden bei isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten, die mit einem I_1 -Virus infiziert wurden, eine gesteigerte Kontraktionskraft und eine vermehrte Phosphorylierung von

PLB nachgewiesen (El-Armouche et al. 2003). Diese vermehrte Phosphorylierung von PLB war das Ergebnis der durch I_1 um 73% verminderten PP1-Aktivität.

Eine vermehrte Phosphorylierung von PLB und eine gesteigerte Kontraktionskraft durch I_1 konnte in neuesten Untersuchungen in einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, indem ein trunkierter I_1 herzspezifisch überexprimiert wurde. Außerdem wurde in diesem Mausmodell eine erhöhte Ca^{2+} -Amplitude festgestellt und die Zellverkürzung war deutlich stärker als in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Pathak et al. 2005).

Für das endogene I_2 gibt es bisher nur ein transgenes Mausmodell, indem ein um 64 Aminosäuren verkürztes I_2 überexprimiert wurde, welches die PP1 irreversibel hemmt. In diesem Mausmodell konnte eine vermehrte Phosphorylierung von PLB, eine gesteigerte Kontraktionskraft, eine deutlich stärkere Zellverkürzung und eine erhöhte Ca^{2+} -Amplitude festgestellt werden. Doch wurde in dem transgenen Mausmodell, welches das verkürzte I_2 überexprimiert, eine erhöhte PP1-Expression festgestellt, wahrscheinlich als Kompensationsmechanismus bedingt durch die irreversible Hemmung der PP1 durch das trunkierte I_2 (Kirchhefer et al. 2005). Eine Erhöhung der PP1-Expression wurde in dem transgenen I_1 -Mausmodell nicht gefunden (Pathak et al. 2005).

Im Gegensatz zur PP1 ist die PP2A auf ihre funktionelle Bedeutung im kardialen System bisher weniger untersucht worden. Es wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt, in dem die katalytische Untereinheit der PP2A ($PP2A_{C\alpha}$) im Herzen überexprimiert wurde. In diesem transgenen Mausmodell konnte durch herzspezifische Überexpression der PP2A eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz induziert werden. Es zeigten sich in den Herzen von 10 Wochen alten transgenen Mäusen mikroskopisch Inseln von Nekrosen und Anzeichen einer beginnenden Fibrose. Bei den transgenen Mäusen wurde eine erhöhte PP2A-Aktivität nachgewiesen und eine erniedrigte Zellverkürzung gefunden. Aufgrund der erhöhten PP2A-Aktivität war der Phosphorylierungsgrad der Proteine TnI und PLB erniedrigt (Gergs et al. 2004). Diese Untersuchung zeigte, dass zusätzlich zur PP1 auch die PP2A eine wichtige funktionelle Bedeutung im kardialen System hat.

Somit war es Ziel dieser Arbeit die Bedeutung der PP1, des PP1-Inhibitors I_2 und der PP2A und für die Regulation der Herzkontraktion weiter zu untersuchen. Zum einen sollte die Expression der PP2A und ihrer Untereinheiten $A\alpha$ und $B56\alpha$ in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht werden. Anhand eines transgenen Mausmodells sollten im Anschluss die Auswirkungen einer herzspezifischen Überexpression der Untereinheit $A\alpha$ auf die Herzkontraktion untersucht werden. Zum anderen sollte die adenovirale Überexpression des I_2 in neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten untersucht werden. Anhand eines transgenen Mausmodells sollten die Auswirkungen einer

herzspezifischen Überexpression des vollständigen I₂ auf die Herzkontraktion untersucht werden im Vergleich zur bestehenden I₂-Maus, die das verkürzte I₂ überexprimiert.

5.1. Expression der Proteinphosphatasen Typ 1 und 2A in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Dilatation des linken und/oder rechten Ventrikels mit begleitender schwerer Einschränkung der Pumpfunktion gekennzeichnet. Die ischämische Kardiomyopathie (ICM) zeichnet sich durch eine kardiale Dysfunktion des nichtischämischen oder des nicht direkt infarktgeschädigten Myokards aus. Die Ursache liegt in einem Remodelierungs-Prozess mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und der vermehrten Ausbildung von interstitiellem Bindegewebe und einer perivaskulären Fibrose.

In früheren Arbeiten wurden humane Herzen mit einer idiopathisch dilatativen Kardiomyopathie auf die Expression von Proteinphosphatasen überprüft (Lüss et al. 2000, Neumann et al. 1997). Dabei wurde in humanen Herzen mit einer terminalen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) eine erhöhte Expression und Aktivität der PP1 vor allem in den Ventrikeln nachgewiesen (Mishra et al. 2002, Neumann et al. 1997). Außerdem zeigte sich in Herzen mit einer terminalen ischämischen und dilatativen Kardiomyopathie eine höhere PP1 und PP2A Expression in Ventrikeln im Vergleich zu den Vorhöfen (Lüss et al. 2000).

Eine erhöhte PP-Aktivität wurde auch in verschiedenen Tiermodellen, z. B. nach chronischer β -adrenerger Stimulation (Boknik et al. 2000) und bei durch Ischämie verursachter Herzinsuffizienz beobachtet (Gupta et al. 2003). In einem transgenen Tiermodell mit kardialer Überexpression der PP2A entwickelte sich eine Herzhypertrophie. Dabei war in den transgenen Herzen die Expression der PP1, Calsequestrin, der sarkolemmalen Ca²⁺-Pumpe SERCA, PLB und der Untereinheiten der PP2A wie A α und B56 α unverändert (Gergs et al. 2004).

Obwohl es bekannt ist, dass PP1 und PP2A etwa 90% der Gesamtaktivität im Säugetierherzen ausmachen (Cohen 1989, MacDougall 1991), gibt es bisher keine Untersuchung für PP2A und ihre Untereinheiten hinsichtlich ihrer Expression in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit die Expression von PP2A und den Untereinheiten A α und B56 α in humanen Herzen, die entweder an einer terminalen ischämischen (ICM) oder dilatativen (DCM) Kardiomyopathie litten, untersucht.

Expression der strukturellen Untereinheit PP2A_{A α}

Von der strukturellen Untereinheit der PP2A (PP2A_{A α}) existieren zwei Isoformen, A α und A β . Sie sind zu 87% in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Hemmings et al. 1990) und im

Säugetiergewebe ist PP2A_{Aα} die vorherrschende Isoform (Hendrix et al. 1993b). PP2A_{Aα} besitzt keine enzymatische Aktivität, kann aber die Aktivität der katalytischen Untereinheit gegenüber bestimmten Substraten regulieren (Kamibayashi et al. 1992). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass aus Schweineherzen isolierte und gereinigte PP2A_{Aα} die Aktivität der katalytischen Untereinheit der PP2A (PP2A_{Cα}) gegenüber Phosphorylase a, Glycogensynthase und Histon H2B hemmt. Rekombinante PP2A_{Aα} aus Insektenzellen hemmte die Phosphataseaktivität gereinigter PP2A_{Cα} des Rindes gegenüber Phosphorylase a und ³²P-markierter MLC (Kamibayashi et al. 1992).

Es können zwei Hypothesen aufgestellt werden, bezüglich der Expression von PP2A_{Aα} in insuffizienten Herzen. Auf der einen Seite könnte die PP2A_{Aα} kompensatorisch höher exprimiert werden, um die PP2A_{Cα}-Aktivität zu senken, da die Expression und die Aktivität der PP1 in humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie erhöht ist. Auf der anderen Seite könnte die PP2A_{Aα} niedriger exprimiert werden, so dass auch die PP2A-Aktivität wie die PP1-Aktivität erhöht ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression von PP2A_{Aα} in insuffizienten humanen Herzen unverändert war. Deshalb spielt PP2A_{Aα} *in vivo* wahrscheinlich keine Rolle bei der Regulation der PP2A-Aktivität im Rahmen der Herzinsuffizienz. Eine Möglichkeit, dass PP2A_{Aα} im Rahmen der Herzinsuffizienz eine Rolle spielt, besteht, wenn das Verhältnis der Untereinheiten der PP2A zueinander wichtig ist. Die Rolle der PP2A_{Aα} bei der Regulation der PP2A könnte in einem transgenen Mausmodell, welches die PP2A_{Aα} herzspezifisch überexprimiert, weiter untersucht werden.

Expression der regulatorischen Untereinheit PP2A_{B56α}

Die Gruppe der B-Untereinheiten ist eine sehr große und vielfältige Gruppe. Allein von B56 sind 5 Isoformen (α, β, γ, δ, ε) bekannt und alle bis auf B56β sind in humanen Kardiomyozyten auf RNA-Ebene nachgewiesen worden. Das PP2A_{B56α}-Gen wurde in einer Region (1q41) lokalisiert (McCright et al. 1996b), die mit einer Form der arrhythmischen Kardiomyopathie des rechten Ventrikels (1q42) in Zusammenhang gebracht wird (Rampazzo et al. 1995). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von PP2A_{B56α} in einem Zusammenhang mit der Entstehung einer Kardiomyopathie steht und aus einer Kardiomyopathie kann sich eine Herzinsuffizienz entwickeln.

Zudem bestimmen die B-Untereinheiten nicht nur die Aktivität und Substratspezifität der PP2A, sondern auch die Lokalisation in der Zelle (McCright et al. 1996a, Tehrani et al. 1996). So wurde PP2A_{B56α} im Zytoplasma als Trimer mit den A und C-Untereinheiten nachgewiesen. Ein anderes Beispiel ist B56γ₁, das im Zellkern vorkommt und dort ein Trimer mit den A und C-Untereinheiten der PP2A bildet (McCright et al. 1996a). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Dimer bestehend aus PP2A_{Aα} und PP2A_{Cα} bei Verwendung von Phosphorylase a als Substrat durch die B-Untereinheit, die aus dem

Rinderherzen gereinigt wurde, gehemmt wurde (Kamibayashi et al. 1992). Dagegen erhöhte die B-Untereinheit PR55 die PP2A-Aktivität, wie das Beispiel der Dephosphorylierung von phosphoryliertem Histon H1 mit Hilfe der B-Untereinheit PR55 zeigt (Agostinis et al. 1992). Diese Befunde sprechen für eine Änderung der Substratspezifität und/oder der subzellulären Verteilung der PP2A durch Bindung verschiedener B-Untereinheiten. Aus diesem Grund lassen sich zwei Hypothesen für die Expression von PP2A_{B56α} in insuffizienten humanen Herzen aufstellen. Auf der einen Seite könnte PP2A_{B56α} die Substratspezifität und die subzelluläre Verteilung der PP2A für wichtige regulatorische Proteine vermitteln, welche auch von PP1 dephosphoryliert werden und die Kontraktion beeinflussen. Aufgrund der erhöhten PP1-Aktivität könnte kompensatorisch eine niedrigere PP2A_{B56α}-Expression erwartet werden. Auf der anderen Seite würde eine unveränderte Expression von PP2A_{B56α} zu der Schlußfolgerung führen, dass PP2A_{B56α} die Substratspezifität und die subzelluläre Verteilung der PP2A für diese regulatorischen Proteine nicht vermittelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von PP2A_{B56α} signifikant erniedrigt war in Herzproben von Patienten, die an einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) litten und deren Herzen eine geringere Kontraktionskraft hatten. Aufgrund der geringeren Kontraktionskraft der DCM-Herzen und die geringere Expression der PP2A_{B56α} scheint PP2A_{B56α} die Substratspezifität und die subzelluläre Verteilung der PP2A für wichtige regulatorische Proteine zu vermitteln, welche die Kontraktion beeinflussen und könnte an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt sein.

Expression der katalytischen Untereinheit PP2A_{Cα}

Die katalytische Untereinheit der PP2A existiert in den zwei Isoformen PP2A_{Cα} und PP2A_{Cβ}. PP2A_{Cα} ist die im kardiovaskulären System vorherrschende Isoform (Knapp et al. 1999, Lüss et al. 2000, Stone et al. 1987). Im Zusammenhang mit der Regenerationsfähigkeit des Herzens nach einem Infarkt spielt PP2A eine Rolle, da nachgewiesen wurde, dass Fostriecin, ein potenter spezifischer PP2A-Inhibitor, die Infarktgröße bei einem künstlichen Infarkt in Kaninchenherzen reduzieren kann (Hastie und Cohen 1998, Weinbrenner et al. 1998). Also könnte PP2A indirekt die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beeinflussen, da sich aus einem Herzinfarkt durch Myokardschädigung eine Herzinsuffizienz entwickeln kann. Neuere Untersuchungen unterstützen diese Hypothese, sie zeigten, dass eine herzspezifische Überexpression der PP2A_{Cα} in einem transgenen Mausmodell eine Herzinsuffizienz auslöste. Diese war gekennzeichnet durch eine Hypertrophie und eine erniedrigte Zellverkürzung der Kardiomyozyten, Inseln von Nekrosen und Anzeichen einer beginnenden Fibrose in Herzen von 10 Wochen alten transgenen Mäusen (Gergs et al. 2004).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass vermutlich die PP2A die Hemmung des für die Proteinsynthese wichtigen Elongationsfaktor EF-2 durch Dephosphorylierung aufhebt, da PP2A die potenteste Proteinphosphatase für EF-2 ist (Redpath et al. 1990). In einem transgenen PP2A_{Cα} überexprimierenden Mausmodell liegt EF-2 vermehrt dephosphoryliert vor (Gergs et al. 2004). Es wird vermutet, dass der geringe Phosphorylierungsgrad des EF-2 und die damit verbundene verstärkte Proteinsynthese mit verantwortlich für die entstehende Herzhypertrophie ist.

Nun stellt sich die Frage, ob die Expression der PP2A_{Cα} in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz erhöht ist und damit ebenso wie PP1 zu einer erhöhten Phosphataseaktivität beiträgt oder kompensatorisch erniedrigt ist aufgrund der erhöhten PP1-Aktivität. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zumindest im linken Ventrikel die Expression von PP2A_{Cα} erniedrigt ist. Demnach könnte die PP2A_{Cα} ebenso wie die PP1 eine Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielen. Es könnte zusätzlich die Hypothese aufgestellt werden, dass die Expression von PP2A_{Cα} kompensatorisch erniedrigt ist, um einer Herzinsuffizienz entgegen zu wirken.

Expression der katalytischen Untereinheit PP1_{Cα} und CSQ

In der Vergangenheit wurde in humanen Herzen mit einer terminalen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) eine erhöhte Expression und Aktivität der PP1 vor allem in den Ventrikeln nachgewiesen (Lüss et al. 2000, Mishra et al. 2002, Neumann et al. 1997).

Die PP1-Expression wurde in dieser Arbeit untersucht, um die Daten von Neumann et al. aus dem Jahr 1997 zu bestätigen. Dabei zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Erhöhung der Expression von PP1 wie in der Literatur beschrieben, obwohl sich eine Tendenz abzeichnet. Es müssten gegebenenfalls weitere humane Herzproben untersucht werden.

Die Expression von Calsequestrin (CSQ) war in humanen Herzen mit einer dilatativen Kardiomyopathie unverändert und konnte als Markerprotein eingesetzt werden, um eine gleichmäßige Proteinbeladung im Western Blot zu überprüfen und gegebenenfalls abzugleichen (Neumann et al. 1997). Dies zeigten auch die Daten dieser Arbeit. Alle Daten von humanen Herzproben mit terminaler Herzinsuffizienz wurden auf CSQ abgeglichen.

Nun stellt sich die Frage, ob bei den humanen Herzproben die Medikation der Patienten einen Einfluss auf die erniedrigte Proteinexpression von PP2A_{Cα} und PP2A_{B56α} hatte oder die Stabilität der Proteine verändert hat, da 45% der Patienten, dessen Herzen untersucht wurden, β -Blocker eingenommen hatten. Einige Untersuchungen zeigten, dass bei β -Blockergabe weniger L-Typ Ca²⁺-Kanäle exprimiert werden (Li Xia et al. 2005, Xiao et al. 2003), andere wiesen eine erhöhte Expression von SERCA und PLB bei unveränderter

Expression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und des Ryanodinrezeptors 2 nach (Yasumura et al. 2003). Die kardiale β -Rezeptoren-Dichte war nur bei dem β -Blocker Metoprolol erhöht nicht bei der Gabe von Carvediol (Gilbert et al. 1996). Es gibt keine Untersuchungen, die zeigen, dass die Expression von Proteinphosphatasen durch β -Blocker-Gabe verändert wird. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von CSQ, $\text{PP2A}_{A\alpha}$ und PP1 nicht reduziert ist. Deshalb kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Gabe von β -Blockern die Expression bzw. die Aktivität von Proteinphosphatasen verändert.

5.2. Generierung transgener Mäuse zur herzmuskelspezifischen Überexpression der strukturellen Untereinheit $A\alpha$ der PP2A

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass PP2A eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz spielt. Dies wurde einerseits über ein transgenes $\text{PP2A}_{C\alpha}$ überexprimierendes Mausmodell (Gergs et al. 2004) gezeigt. Andererseits wurde ein Zusammenhang zwischen PP2A und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz über eine Steigerung der Regenerationsfähigkeit nach einem künstlichen Herzinfarkt bei Kaninchen durch Hemmung der PP2A mit Fostriecin nachgewiesen. Die Steigerung der Regenerationsfähigkeit nach einem künstlichem Herzinfarkt bei Kaninchen wurde durch eine Infarktreduzierung nachgewiesen (Hastie und Cohen 1998, Weinbrenner et al. 1998). Also kann PP2A indirekt die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beeinflussen, da sich aus einem Herzinfarkt durch Myokardschädigung eine Herzinsuffizienz entwickeln kann.

Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass $\text{PP2A}_{A\alpha}$ im Endstadium einer Herzinsuffizienz vermutlich keine Rolle spielt, da die Expression von $\text{PP2A}_{A\alpha}$ in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz unverändert war. Um aufzuklären, ob $\text{PP2A}_{A\alpha}$ bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielt, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, in dem $\text{PP2A}_{A\alpha}$ herzspezifisch mit Hilfe des α -MHC-Promotors (MHC = myosin heavy chain) überexprimiert werden sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kodierende Sequenz der strukturellen Untereinheit $A\alpha$ der PP2A mittels PCR amplifiziert. Zusammen mit dem α -MHC-Promotor wurde eine Expressionskassette kloniert. Das Insert ($\text{PP2A}_{A\alpha}$) wurde auf die richtige Orientierung überprüft und das Ergebnis war, dass zwei Expressionskassetten, eine mit richtiger 5'-3'- (Sense-Konstrukt) und die andere mit falscher 3'-5'-Orientierung (Antisense-Konstrukt), kloniert wurden. Wenn beide Gene chromosomal integriert und transkriptorisch aktiv sind, sollte das Sense-Konstrukt eine Überexpression der $\text{PP2A}_{A\alpha}$ und das Antisense-Konstrukt eine Eliminierung des endogenen $\text{PP2A}_{A\alpha}$ auf mRNA-Ebene bewirken. Somit könnte untersucht werden, wie sich die kardiale Abwesenheit von $\text{PP2A}_{A\alpha}$ auf die Funktion der PP2A, auf die PP2A-Aktivität und auf den Phosphorylierungsgrad verschiedener regulatorischer Proteine wie z.B. PLB oder SERCA auswirkt. Zudem müsste beantwortet

werden, wenn die PP2A funktionell weniger aktiv ist, ob und wie ihre Funktion kompensiert wird. Mit der Überexpression der PP2A_{Aα} könnte sowohl die weitere Funktion der PP2A_{Aα} in Kardiomyozyten als auch die Rolle der PP2A_{Aα} bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz untersucht werden.

Untersuchungen an diesen Tieren, wie Genotypisierung und die Untersuchung der Proteinexpression, werden im Arbeitskreis von Prof. Neumann an der Universität in Halle fortgeführt.

5.3. Herzspezifische Überexpression des vollständigen I₂ der PP1 in transgenen Mäusen

Dieses transgene Mausmodell wurde zum Vergleich mit der trunkierten I₂-Maus generiert, um mögliche Veränderungen in der Funktion der verkürzten (trunkierten) Version des I₂ vergleichend zur vollständigen Form zu untersuchen. Es ist festzuhalten, dass das trunkierte I₂ neben der Deletion von 64 Aminosäuren eine defekte Phosphorylierungsstelle an Threonin 72 besitzt. Diese Phosphorylierungsstelle ist verantwortlich für die Reaktivierbarkeit eines Komplexes, der von I₂ und PP1 gebildet wird (Park et al. 1994b, Yang et al. 2000). Denn gemäß dem Modell von Park und DePaoli Roach (1994) sollte I₂ in einem ersten Schritt an die PP1 binden und diese inhibieren, danach einen stabilen inaktiven Komplex mit der PP1 bilden. Das vollständige I₂ kann an Threonin72 (Thr72) phosphoryliert werden, das trunkierte I₂ jedoch nicht. Nicht phosphoryliertes I₂ hemmt die PP1 und durch Phosphorylierung des I₂ an Thr72 wird der PP1-I₂-Komplex reaktiviert. Somit wird die PP1 von dem trunkierten I₂ irreversibel gehemmt und steht der Zelle nicht mehr zur Verfügung. Dieses Ergebnis könnte der Grund für die deutliche kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression und die um 80% erniedrigte PP1-Aktivität im transgenen Mausmodell, indem das trunkierte I₂ exprimiert wurde, sein (Kirchhefer et al. 2005).

In dem trunkierten I₂-Mausmodell fiel im Gegensatz zu den adenoviral infizierten neonatalen Kardiomyozyten die starke kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression (~7-fache) auf. Die Verbesserung der Zellverkürzung und die Erhöhung der Ca²⁺-Amplitude des trunkierten I₂-Mausmodell (Kirchhefer et al. 2005) war vergleichbar mit der trunkierten I₁-Maus (Pathak et al. 2005) und den Ca²⁺-Messungen des neonatalen Kardiomyozyten. Nun stellte sich die Frage, ob das trunkierte I₂ für die starke Hemmung der Gesamtaktivität und die starke kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression verantwortlich ist. Welche Wirkungen das vollständige I₂ in einem transgenen Mausmodell im Gegensatz zur trunkierten I₂-Maus hat, ist ebenfalls von Interesse. Das transgene Mausmodell, welches das vollständige I₂ exprimiert, könnte ähnliche Ergebnisse liefern wie die trunkierten I₁- und I₂-Mäuse, ohne dass es zu einer Erhöhung PP1-Expression kommt. Vielleicht kommt es in dem transgenen Mausmodell, dass

das vollständige I₂ überexprimiert, zu einer Erhöhung der PP1-Expression, die entweder geringer oder gleich ausfällt wie in dem trunkierten transgenen I₂-Mausmodell.

In dem hier untersuchten transgenen Mausmodell wurde das vollständige I₂ unter Kontrolle des α -MHC-Promotors wie auch bei der trunkierten I₂-Maus exprimiert. Eine I₂-Überexpression besteht daher bereits von Geburt an (Gulick et al. 1991, Ng et al. 1991, Robbins et al. 1990, Subramaniam et al. 1991).

Es konnten mehrere transgene Mauslinien generiert werden, jedoch gab es Unterschiede in der Höhe der I₂-Expression. Demnach hatte eine Mauslinie (Nachkommen des Founder 2, s. 4.2.2.) eine geringere Expression von I₂ als alle anderen Linien. Die anderen Mauslinien hatten eine starke Überexpression von I₂ mit geringen Unterschieden in der I₂-Expression (Nachkommen der Founder 4,5 und 7, s. 4.2.2.).

Die Identität des I₂-Signals und die Spezifität des Antikörpers konnte durch die Unterdrückung des Signals durch rekombinanten humanen I₂ aus *E. coli* (rek I₂) bestätigt werden.

Danach wurde die Expression der PP1, des direkten Zielproteins von I₂, untersucht, und es stellte sich heraus, dass die PP1-Expression in den transgenen Mäusen um 30% gegenüber den WT-Mäusen erhöht war. Diese Daten stehen deutlich im Gegensatz zu den trunkierten I₂-Mäusen, die eine 700%ige Erhöhung der PP1-Expression zeigten (Kirchhefer et al. 2005). Möglich ist, dass die Reaktivierbarkeit des PP1-I₂-Komplexes (Park und DePaoli Roach 1994) der Grund für diese Ergebnisse darstellt, denn in trunkierten I₂-Mäusen wird die PP1 im Gegensatz zur transgenen Maus, welche das vollständige I₂ exprimiert, irreversibel gehemmt. Somit muss in den trunkierten I₂-Mäusen die PP1 wahrscheinlich höher exprimiert werden, um noch PP1-Aktivität zu erhalten. Zudem wurde im Adenovirussystem, bei einer Überexpression von vollständigem I₂, keine Erhöhung der PP1-Expression (Balzer 2004) festgestellt.

Nach dem Nachweis der I₂-Expression mittels Western Blot wurde die Verteilung des I₂ mit Hilfe der Immunhistologie nachgewiesen. Das überexprimierte I₂ wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachgewiesen. Ob I₂ auch wirklich im Kern vorhanden war oder es sich nur um Überlagerungen handelte, konnte durch eine 3D-Rekonstruktion geklärt werden. Diese bestätigte, dass I₂ sich auch im Kern befand. Dieser Befund bestätigt vorherige Untersuchungen, die I₂ entweder im Zytoplasma oder Zellkern nachwiesen, je nachdem in welcher Phase des Zellzyklus sich die zu untersuchenden Zellen befanden (Kakinoki et al. 1997). Dieser Befund widerspricht Untersuchungen, die I₂ als rein zytosolisches Protein beschrieben (Bollen und Stalmans 1992). Auch in der transgenen trunkierten I₂-Maus wurde nur eine Verteilung im Zytoplasma der Kardiomyozyten gefunden (Kirchhefer et al. 2005). Jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur gezeigt

werden, dass I_2 im Zellkern vorkommt, ob I_2 im Zellkern aktiv ist und welche Funktion I_2 im Kern hat, muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden. In den Herzquerschnitten von verschiedenen Foundern fanden wir drei verschiedene Verteilungsformen, erstens eine I_2 -Expression um das Herzlumen, zweitens ein Mosaizismus und drittens eine flächendeckende Verteilung. Wenn diese Unterschiede in der Expression und in der Verteilung im Herzmuskelquerschnitt konstant weitervererbt würden, könnte untersucht werden, welche Ergebnisse eine hohe und eine niedrige Überexpression oder aber die unterschiedliche Verteilung im Herzmuskel zur Folge hätten.

Weiterhin wurde die Gesamtposphataseaktivität der transgenen Herzhomogenate gemessen und es zeigte sich eine Erniedrigung der Gesamtposphataseaktivität um 57% und der PP1-Aktivität um 88% gegenüber den WT-Herzen. Dagegen war beim trunkierten I_2 -Mausmodell die Gesamtaktivität um 80% erniedrigt (Kirchhefer et al. 2005) und die PP1-Aktivität um 95% (Brüchert 2004).

5.4. Adenovirale Expression des I_2 der PP1

Die PP1 hat eine Bedeutung bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Dies wurde am Menschen über eine erhöhte Expression der PP1_{C α} bei einer terminalen dilatativen Kardiomyopathie (Neumann et al. 1997) nachgewiesen. Zudem wurde die Bedeutung der PP1 bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz über ein transgenes PP1_{C α} überexprimierendes Mausmodell gezeigt (Carr et al. 2002). Durch einen Adenovirus, der I_1 der PP1 überexprimiert, wurde bei adulten Rattenkardiomyozyten eine verbesserte Zellverkürzung, eine erhöhte Phospholambanphosphorylierung und in neonatalen Rattenkardiomyozyten eine deutlich erniedrigte PP1-Aktivität nachgewiesen (El-Armouche et al. 2003). Dem entsprechend zeigte ein transgenes Mausmodell in dem ein trunkiertes I_2 überexprimiert wurde, eine um 80% erniedrigte Gesamtposphataseaktivität, eine erhöhte Phospholambanphosphorylierung und eine verbesserte Zellverkürzung. Bei der I_2 -Maus, welche trunkiertes I_2 überexprimierte, war die PP1-Expression kompensatorisch erhöht (Kirchhefer et al. 2005). Alle Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle der PP1 in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, da bei erniedrigter PP1-Aktivität eine deutliche Verbesserung der Kontraktilität bei Kardiomyozyten zu beobachten war.

Somit wurde ein I_2 überexprimierender Adenovirus (I_2 -Virus) generiert, um die PP1-Aktivität über diesen Inhibitor in vitro zu beeinflussen und auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Zusätzlich wurde durch den I_2 -Virus das grün fluoreszierende Protein (GFP) zur Kontrolle des Infektionsverlaufes exprimiert. Zuerst wurde der I_2 -Virus in der H₉C₂-Zelllinie (ATCC, Manassas, USA), eine Zelllinie, die aus embryonalem Rattenmyokard gewonnen wurde (Kimes und Brandt 1976) untersucht.

Die Überexpression von I₂ wurde auf Proteinebene in I₂-Virus infizierten H₉C₂-Zellen nachgewiesen. Die PP1-Expression war in diesen Zellen nicht kompensatorisch erhöht, so dass davon ausgegangen wurde, dass es bei Kardiomyozyten durch Hemmung der PP1-Aktivität nicht zwangsläufig eine kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression gibt. In H₉C₂-Zellen war eine inhibitorische Wirkung von I₂ durch eine Erniedrigung der PP1-Aktivität nachweisbar (Balzer 2004).

Jedoch ist zu bedenken, dass es sich bei den im trunkierten Mausmodell und im Adenovirussystem exprimierten Proteinen um unterschiedliche Formen des I₂ handelt. Im Gegensatz zur am C-terminalen Ende trunkierten I₂-Sequenz (140 Aminosäuren [AS]) wird im adenoviralen System die gesamte humane I₂-Sequenz (204 AS) exprimiert. Aufgrund der Deletion von 64 AS des I₂ und der kompensatorischen Erhöhung der PP1-Expression in diesen transgenen Mäusen wurde zusätzlich zu dem I₂-Adenovirus wie vorher erwähnt ein transgenes Mausmodell generiert, welches das vollständige I₂ exprimiert. In diesem Mausmodell war die kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression zwar auch vorhanden, aber deutlich weniger ausgeprägt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem I₂-Virus infizierte Zelllinien (A₇R₅-Zellen) und Primärzellen (neonatale und adulte Rattenkardiomyozyten, glatte vaskuläre Muskelzellen) untersucht.

Adenovirale Expression des I₂ der PP1 in neonatalen Kardiomyozyten

Bisher wurde I₂ herzspezifisch nur im Rahmen eines transgenen Mausmodells (Kirchhefer et al. 2005) oder in vitro auf seine Interaktion mit der katalytischen Untereinheit CS1 der PP1 (Yang et al. 2000) untersucht. Um nun die Auswirkungen einer akuten Überexpression in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem I₂-Virus infiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass neonatale Rattenkardiomyozyten eine von der Infektionszeit und der Viruskonzentration abhängige Expression des I₂ zeigten (Balzer 2004). Die neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten auch nach einer Infektionszeit von 72 h eine typische Morphologie, hafteten an der Kulturschale und kontrahierten spontan, so dass sie für die Messung von Ca²⁺-Transienten benutzt werden konnten. Das GFP störte dabei die Ca²⁺-Messungen nicht, da sich Anregungs- und Emissionswellenlängen des GFP (470 nm bzw. 508 nm) von den jeweiligen Wellenlängen des Indo-1-Farbstoffes (365 nm bzw. 405 und 495 nm) unterschieden.

Zuerst wurden die mit dem I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten immunhistologisch untersucht und zwar auf die I₂-Expression und auf das Markerprotein CSQ hin. Dabei zeigte sich eine homogene Verteilung innerhalb des Zytoplasma der neonatalen Kardiomyozyten parallel zu der Verteilung des endogenen CSQ. Die beobachtete Verteilung deckt sich mit der Verteilung des trunkierten I₂ in dem transgenen Mausmodell.

Danach wurde die Phosphataseaktivität untersucht und es stellte sich heraus, dass die Gesamtaktivität in Homogenaten von I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten um 30% gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt war. In den Herzhomogenaten transgener trunkierter I₂-Mäuse war die Gesamtaktivität um 80% gegenüber Wildtyp-Mäusen erniedrigt. Die Gründe für die geringere Hemmung der Gesamtaktivität der I₂ infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten könnten die geringere Aktivität des I₂, eine geringere I₂-Expression oder eine erhöhte Aktivität anderer Proteinphosphatasen z.B. PP2A sein. Die PP1-Aktivität war in I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten um 63% erniedrigt. Die Verringerung der PP1-Aktivität wurde bei der transgenen Maus nicht angegeben, aber es ist sehr wahrscheinlich, dass die Erniedrigung der PP1-Aktivität analog zur Gesamtaktivität etwas höher ist als bei den neonatalen Kardiomyozyten. Dieses war zu erwarten, da das trunkierte I₂ nicht an Threonin72 (Thr72) phosphoryliert werden kann, und somit kann der Komplex, den I₂ mit der PP1 bildet, nicht reaktiviert werden (Park et al. 1994, Yang et al. 2000). Der Effekt des I₁-Adenovirus wurde als Abweichung von der Gesamtaktivität angegeben und war mit einer Erniedrigung von 73% bei der I₁ infizierten Gruppe ähnlich hoch wie bei den trunkierten transgenen I₂-Mäusen mit um 80% verringerter Gesamtaktivität. Bei dem transgenen trunkierten I₁-Mausmodell war die PP1-Aktivität nur um 15% gegenüber Wildtyp-Mäusen erniedrigt (Pathak et al.2005).

Zudem zeigte sich bei den I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten gegenüber der Kontrollgruppe eine um 50% erhöhte Ca²⁺-Amplitude. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem trunkierten I₂-Mausmodell (Kirchhefer et al. 2005). Bei dem trunkierten I₁-Mausmodell wurde veröffentlicht, dass die Ca²⁺-Amplitude erhöht war (Pathak et al. 2005). Außerdem zeigte sich bei den I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten, dass weder der systolische noch der diastolische Ca²⁺-Gehalt der Kardiomyozyten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verändert war. Auch die Zeit, nach der 50% des freigesetzten Ca²⁺ wieder ins sarkoplasmatische Retikulum (T₅₀) befördert wurde, war unverändert. Im Gegensatz dazu war die T₅₀ bei dem transgenen I₁-Mausmodell deutlich erniedrigt. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass die verringerte T₅₀ an einer kompensatorisch erhöhten SERCA-Aktivität liegen könnte, da die SERCA-Expression im transgenen I₁-Mausmodell nicht erhöht war (Pathak et al. 2005), jedoch konnte diese Vermutung bisher nicht bestätigt werden. Die mit I₂-Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten hatten keine erniedrigte T₅₀. Die erhöhte Ca²⁺-Amplitude und die unveränderte T₅₀ könnten eine Folge einer vermehrten Ca²⁺-Freisetzung durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) sein. Denn Marx et al. (2000) beobachteten eine Abnahme der Proteinphosphatasen im RyR-Komplex (Marks et al. 2001) und eine Hyperphosphorylierung des RyR in chronisch insuffizienten menschlichen Herzen. Zudem wurde bei diesen chronisch insuffizienten menschlichen Herzen eine vermehrte, aber unkontrollierte, Ca²⁺-Freisetzung durch den RyR beobachtet. Diesen Daten widersprechen

die konstant erhöhten Ca^{2+} -Transienten, die bei den mit dem I_2 -Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten gefunden wurden. Es könnte jedoch sein, dass eine konstante Hemmung mit einer Reaktivierbarkeit der PP1 eine vermehrte kontrollierte Ca^{2+} -Freisetzung durch den RyR zur Folge hat. Es sollten weitere Untersuchungen zu der Expression und dem Phosphorylierungsgrad des RyR und der SERCA an I_2 -Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten erfolgen, um diesen Sachverhalt zu klären.

Diese *in vitro* Ergebnisse unterstreichen die *in vivo* Befunde am transgenen trunkierten I_2 -Mausmodell. Sie zeigen weiterhin, dass eine kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Transienten hat, da das trunkierte I_1 -Mausmodell und die mit dem I_2 -Virus infizierten neonatalen Kardiomyozyten mit einer geringeren Hemmung der PP1-Aktivität und keiner kompensatorischen Erhöhung der PP1-Expression eine Erhöhung der Ca^{2+} -Amplitude zeigen konnten. Somit bleibt festzuhalten, dass erhöhte Ca^{2+} -Transienten in I_2 -infizierten neonatalen Kardiomyozyten durch eine 30%ige Hemmung der PP1-Aktivität und ohne kompensatorische Erhöhung der PP1-Expression beobachtet werden konnten im Gegensatz zu der transgenen trunkierten I_2 -Maus. Diese Befunde könnten daraufhin deuten, dass die PP1 eine von mehreren Proteinphosphatasen ist, die Ca^{2+} -Transienten erhöhen können.

Adenovirale Expression des I_2 der PP1 in adulten Rattenkardiomyozyten

Nun stellte sich die Frage, ob I_2 auch in adulten Rattenkardiomyozyten adenoviral überexprimiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass I_2 in adulten Rattenkardiomyozyten deutlich überexprimiert wurde. Mehr konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden, es wäre jedoch hinsichtlich der Proteinphosphataseregulation, Ca^{2+} -Homöostase und I_2 -Verteilung interessant die Versuche an neonatalen auch bei den adulten Rattenkardiomyozyten vergleichend durchzuführen und mit den Daten für adenoviral überexprimierten I_1 zu vergleichen.

Adenovirale Expression des I_2 der PP1 in vaskulären glatten Muskelzellen

Es ist bekannt, dass es sich im vaskulären glatten Muskel um PP1 als katalytisch aktiven Bestandteil der MLCP (Shima et al. 1993) handelt und zwar bildet die PP1 mit der substratspezifischen Untereinheit MYPT1 und einer kleinen ca. 20 kDa großen Untereinheit (M20) die MLCP (Hartshorne und Erdödi 2004). Es ist weiter bekannt, dass die Ca^{2+} -unabhängige Hemmung der MLCP zur Entwicklung eines zerebralen Vasospasmus führt (Tani 2002). In den bisherigen Untersuchungen mit endogenen Inhibitoren konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass weder I_1 noch I_2 der PP1 selbst in mikromolaren Konzentrationen die MLCP hemmt (Eto et al. 2000) und dass nur CPI-17 an PP1-MYPT1-

Komplexe binden kann und nicht I_2 (Eto et al. 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass I_2 zwar in glatten vaskulären Muskelzellen vorkommt, aber dass weder die Funktion des I_2 in glatten vaskulären Muskelzellen noch die Frage geklärt ist, wie sich adenoviral überexprimiertes I_2 auf zellulärer Ebene oder überexprimiertes I_2 in einem Mausmodell verhält.

Adenovirale Expression des I_2 der PP1 in A₇R₅-Zellen

Deshalb untersuchten wir zunächst mit dem I_2 -Virus infizierte A₇R₅-Zellen, eine kontinuierlich wachsende Zelllinie, die aus glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta von fötalen Ratten kloniert wurde (Kimes und Brandt 1976). Bei diesen Zellen zeigte sich eine Proteinexpression von I_2 , die abhängig von der eingesetzten Virusmenge linear anstieg. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen, die bei H₉C₂-Zellen und bei den neonatalen Rattenkardiomyozyten beobachtet wurden. Zudem wurde in der Immunhistologie bei infizierten A₇R₅-Zellen eine homogene Verteilung des I_2 im Zytoplasma gezeigt, wie bei dem transgenen trunkierten I_2 -Mausmodell (Kirchhefer et al. 2005) und den neonatalen Kardiomyozyten, jedoch nicht im Zellkern. Diese Ergebnisse zeigen, dass vaskuläre glatte Muskelzellen adenoviral mit dem I_2 -Virus infiziert werden können und I_2 auf Proteinebene exprimierten.

Adenovirale Expression des I_2 der PP1 in glatten vaskulären Muskelzellen (SMC)

Nach Charakterisierung des I_2 -Virus in einer Zelllinie wurden primäre glatte vaskuläre Muskelzellen untersucht.

Auch bei diesen Primärzellen zeigte sich eine I_2 -Expression, welche linear mit steigender Viruskonzentration anstieg. Wiederum diente GFP zur Kontrolle der Infektion. Die I_2 -Expression wurde mittels Immunhistologie untersucht und es zeigte sich eine homogene Verteilung von I_2 im Zytoplasma. Zudem schien I_2 auch im Zellkern vorzukommen, jedoch könnte es sich auch um Überlagerungen von über dem Zellkern liegendem I_2 handeln. Dies müsste noch in weiteren Versuchen überprüft werden.

Unveröffentlichte Daten, wobei Homogenate infizierter SMC untersucht wurden, wiesen eine deutliche Hemmung der Gesamtphosphataseaktivität auf. Nun kann man folgende Hypothesen aufstellen: entweder hat I_2 auf zellulärer Ebene doch eine Wirkung auf die MLCP, welche PP1 enthält, oder aber es wurde die Aktivität von anderen PP1-Holoenzymen gehemmt. Dies ist eine Frage, welche noch näher untersucht werden müsste.

5.5. Glattmuskelspezifische Überexpression des vollständigen I₂ der PP1 in transgenen Mäusen

Es ist bekannt, dass die Ca²⁺-unabhängige Hemmung der MLCP zur Entwicklung eines zerebralen Vasospasmus führt (Tani 2002). Außerdem konnte eine deutliche Hemmung der PP1-Aktivität in I₂-Virus infizierten glatten Muskelzellen gezeigt werden und die Frage aufwirft, ob I₂ nicht doch einen Effekt auf die MLCP hat (Grote 2004).

Deshalb generierten wir ein transgenes Mausmodell, in dem humanes I₂ unter Kontrolle des SM-MHC-Promotor in glatten Muskelzellen exprimiert werden sollte. Dieser Promotor stammt aus dem Kaninchen und ist auch in Mäusen aktiv, jedoch schwächer. Er ist ab dem Tag 11 der Embryogenese in glatter Muskulatur aber auch im Myokard transkriptional aktiv, jedoch verliert er die kardiale Aktivität bis zur Geburt und ist nur noch in glatter Muskulatur aktiv, dabei in Arterien mehr als im Gastrointestinaltrakt und in Venen.

Es konnten, wie unter 4.4. beschrieben, zwei transgene Mauslinien etabliert werden, die das Transgen stabil weitervererbten, jedoch I₂ auf Proteinebene nicht exprimierten. Mittels PCR konnte zwar in genomischer DNA die Integration der Expressionskassette detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Untersuchung der mRNA durchgeführt. Nun könnte es aber sein, dass die Expressionskassette beschädigt oder unvollständig integriert wurde. Eine fehlerhafte Integration würde die fehlende Proteinexpression erklären, wenn jedoch die Integration unversehrt und vollständig war, müsste der Fehler auf den Ebenen der Transkription oder Translation liegen. Es sollen im Folgenden einige der in Frage kommenden Gründe besprochen werden, jedoch können die Gründe für das Ausbleiben der Überexpression von I₂ vielseitig sein, und eine eindeutige Erklärung ist aufgrund des komplexen Modells der transgenen Maus schwer zu finden.

Nach Mikroinjektion in den Vorkern einer fertilisierten Eizelle (Ein-Zell-Embryo) integriert die Fremd-DNA oft in mehreren, direkt gekoppelten Kopien (10-1000) meist an einem willkürlichen Ort im Genom. Deshalb sind integrierte Fremdgene häufig chromosomalen Positionseffekten ausgesetzt, die das Expressionsniveau negativ beeinflussen können (Bishop 1996). Der SM-MHC-Promotor besitzt einen vaskulär-spezifischen Enhancer (Kallmeier et al. 1995) und Enhancer können die *in vitro*-Expression von Zielgenen steigern (Ribault et al. 2001). Umgekehrt können zufällig am Integrationsort vorhandene, gegenteilig wirkende Sequenzen (*silencer*) die Transkription abschwächen. Es gibt Teile von Chromosomen, die ursprünglich als Heterochromatin bezeichnet wurden und während der Interphase kondensiert bleiben, und wenn das Transgen in eine solche Region integriert wird, kommt es zu keiner Proteinexpression. Diese Bereiche sind von sehr niedriger Gendichte (Dillon und Festenstein 2002, Henikoff 2000, Hennig 1999). Weitere Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass es DNA-Sequenzen (sog. Protosilencer)

gibt, die die transkriptionale Aktivität in einzelnen DNA-Abschnitten oder ganzer Chromosomen (z.B. X-Chromosom) durch Heterochromatinentwicklung unterdrücken. Solche Protosilencersequenzen sind in Promotorregionen von Genen gefunden worden, die an der transkriptionalen Aktivierung beteiligt sind (Fourel et al. 2002). Bei der Fülle von Transkriptionsfaktoren scheint es, dass eine transkriptionale Inaktivierung (*silencing*) von Fremdgenen nicht direkt an die Eigenschaften des Gens oder des Promotors gebunden sein muss.

Bei der Translation der SM-MHC-I₂-Expressions-kassette könnten untranslatierte Regionen (UTR) fehlen, denn es ist bekannt, dass 5'- und 3'-UTRs einen großen Einfluß auf die Translation und Stabilität von mRNAs haben. Somit könnten fehlende UTR's ein Grund für die Nichtexpression des I₂ in glatter Muskulatur sein.

5.6. Ausblick

Proteinphosphatasen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie. Die PP1-Expression ist bei einer terminalen Herzinsuffizienz erhöht, aber die genauen Mechanismen, die zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen, sind weiterhin unbekannt.

Die PP1 und PP2A wurden in dieser Arbeit weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer terminalen Herzinsuffizienz deutliche Veränderungen in der Expression der PP2A und ihrer Untereinheiten A α und B56 α bestehen. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Ca²⁺-Amplitude durch adenoviral überexprimiertes I₂ in neonatalen Kardiomyozyten nachgewiesen, was zu einer verbesserten Kontraktilität führte.

Ein therapeutischer Einsatz von Adenoviren bei einer Herzinsuffizienz (z.B. als Gentherapie) wäre allerdings nur denkbar, wenn Adenoviren entwickelt würden, welche gewebspezifisch infizieren und z.B. I₂ überexprimieren, um so speziell nur bestimmte Zellen zu behandeln wie z.B. Herzmuskelzellen oder vaskuläre glatte Muskelzellen. Aber auch ohne diese Möglichkeit der Gentherapie, wären therapeutische Ansätze, welche die Aktivität der Proteinphosphatasen der Herz- oder der glatten Muskulatur beeinflussen, denkbar.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Proteinphosphatasen Typ 1 und 2A bei der Entwicklung von Herzinsuffizienzen zu untersuchen. Hierzu wurden humane Herzproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht, verschiedene transgene Mausmodelle generiert und mit einem I_2 -Adenovirus infizierte Zellen untersucht.

In einem transgenen Mausmodell konnte eine Überexpression der Proteinphosphatase 2A eine Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz auslösen. Dieses transgene Mausmodell zeigt die Bedeutung der Proteinphosphatase 2A in der Entwicklung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erniedrigte Expression der $PP2A_{C\alpha}$ und der $PP2A_{B56\alpha}$ in humanen Herzen, welche von Patienten mit einer terminalen Herzinsuffizienz stammten, gezeigt. Es könnte vermutet werden, dass die $PP2A$ kompensatorisch zur $PP1$ erniedrigt ist. Eine kompensatorische Erhöhung der $PP1$ -Expression wurde z.B. in dem transgenen Mausmodell, welche einen trunkierten Inhibitor 2 der $PP1$ überexprimierte, nachgewiesen. Aufgrund der erniedrigten Expression der $PP2A_{C\alpha}$ und der $PP2A_{B56\alpha}$ in humanen Herzen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine transgene Maus generiert, um die Funktion der $PP2A_{A\alpha}$ weiter zu untersuchen. Im Gegensatz dazu konnte eine Hemmung der $PP1$ -Aktivität durch I_2 auf zellulärer Ebene zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Amplituden um 50% führen und deshalb die Kontraktilität der Kardiomyozyten verbessern. Die Hemmung der $PP1$ -Aktivität war in dem trunkierten I_2 -Mausmodell mit einer Hemmung um 95% sehr viel höher als bei akut adenoviral infizierten Kardiomyozyten mit einer Hemmung um 63%. Es muß festgehalten werden, dass es sich bei diesen zwei Modellen um unterschiedliche I_2 handelte. Das trunkierte I_2 war ein verkürztes I_2 mit einer defekten Phosphorylierungsstelle an Threonin 72, im Gegensatz dazu war das adenoviral überexprimierte I_2 vollständig. Beide Modelle hatten den gleichen Effekt, eine um 50% erhöhte Ca^{2+} -Amplitude, so dass vermutet werden könnte, dass das trunkierte I_2 verantwortlich für die hohe Hemmung der $PP1$ -Aktivität und die kompensatorische Erhöhung der $PP1$ -Expression war. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Maus generiert, welche das vollständige I_2 exprimiert. Insgesamt konnte die Erhöhung der Ca^{2+} -Amplitude über eine Hemmung der $PP1$ -Aktivität durch I_2 -Überexpression weitere Hinweise liefern, dass I_2 als Ansatzpunkt für neue medikamentöse Therapien bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz dienen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte I_2 in glatten Muskelzellen überexprimiert werden, was eine geringere $PP1$ -Aktivität zur Folge hatte. Es wurde ein transgenes Mausmodell generiert, welches I_2 unter Kontrolle des glattmuskelspezifischen SM-MHC-Promotors überexprimieren sollte. Bei diesem transgenen Mausmodell wurden Mäuse mit einem transgenen Genotyp gefunden, jedoch reichte die Aktivität des Promotors nicht aus, um eine Überexpression von I_2 zu gewährleisten. Es müssten andere glattmuskelspezifische Promotoren getestet werden.

7. Summary

Relevance of the proteinphosphatases 1 and 2A in the cardiovascular system

The aim of this work was to determine the relevance of the proteinphosphatases 1 and 2A in the development of heart failure. Therefore, we examined human heart samples of patients with endstage heart failure, generated different transgenic mouse models and conducted experiments with I₂-adenovirus infected cells.

In a transgenic mouse model of proteinphosphatase 2A overexpression, cardiac hypertrophy and heart failure could be released, demonstrating the relevance of proteinphosphatase 2A in the development of cardiac hypertrophy and heart failure. However, in human heart samples of patients with end-stage heart failure a decreased expression of PP2A_{Cα} and PP2A_{B56α} was detected. It is presumed that this reduction of PP2A expression might be a compensatory mechanism in response to an increased PP1 expression level. For instance, a compensatory increase of PP1-expression was demonstrated in a transgenic mouse model overexpressing a truncated inhibitor 2 of PP1. Because of the decreased expression of PP2A_{Cα} and PP2A_{B56α} in human hearts a transgenic mouse was generated to further examine the function of PP2A_{Aα}. By contrast, an inhibition of PP1-activity by I₂ on a cellular level could increase Ca²⁺-amplitudes by about 50% and that way ameliorate cardiomyocyte contractility. The inhibition of PP1-activity by 95% in a mouse model overexpressing a truncated form of I₂ was much stronger than in acute adenoviral infected cardiomyocytes, showing an inhibition of about 63%. It must be noted, that these are mouse models using two different forms of I₂. Truncated I₂ was a shortened I₂ containing a defective phosphorylation site at threonin 72, in contrast the adenoviral overexpressed I₂ was a full-length form. Both models showed the same effect on Ca²⁺-amplitude, namely an increase by about 50%. Therefore it could be supposed that the truncated I₂ might be responsible for the strong inhibition of PP1-activity and compensatory increase in PP1-expression. Hence in this work a mouse model was generated expressing the full-length I₂. Overall, the increase of the Ca²⁺-amplitude via an inhibition of PP1-activity by I₂-overexpression delivered further evidence that I₂ could serve as a starting point for new medicamentous therapies of cardiac hypertrophy and heart failure. Within the scope of this work I₂ was overexpressed in smooth muscle cells, resulting in a decreased PP1-activity. A transgenic mouse model was generated overexpressing I₂ under control of the smooth muscle specific SM-MHC-promoter. Mice exhibiting a transgenic genotype could be detected, however, the activity of the promoter was not sufficient for a detectable I₂ overexpression. Further smooth muscle cell specific promoters have to be tested.

8. Anhang

8.1. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Radioaktive Substanzen wurden von Hartmann Analytics (Braunschweig) oder von NEN-DuPont (Bad Homburg) bezogen. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen. Hochohmiges Wasser wurde in einer Purelab Classic-Reinstwasseranlage (Purelab Classic, USF Seral, Ransbach-Baumbach) erzeugt.

Untersuchungsmaterial

PBS pH 7.45	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8.1 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	pH 7.45 autoklavieren	
Tyrodelösung	NaCl	119.8 mM
	KCl	5.4 mM
	CaCl ₂	1.8 mM
	MgCl ₂	1.05 mM
	NaH ₂ PO ₄	0.42 mM
	NaHCO ₃	22.6 mM
	Na ₂ EDTA	0.05 mM
	Ascorbinsäure	0.28 mM
	Glukose	5.05 mM
pH 7.4 mit Carbogen		
Arbeitstechniken mit Proteinen		
Homogenisationspuffer A	Tris-HCl pH 7.4	20 mM
	EDTA	1 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Dithiothreitol	1 mM
	PMSF	1 mM
	Leupeptin	5 µg/ml
	Puffer frisch ansetzen	
P1-Puffer	NaHCO ₃	10 mM
	NaF	50 mM
	Na ₄ PO ₇	5 mM
	pH 7.4	

SDS-PAGE-Probenpuffer	Tris-HCl	62.5 mM
	SDS	10% (m/V)
	Glycerol	20% (V/V)
	Bromphenolblau	q. s.
	pH 6.8	
	vor Gebrauch frisch zusetzen:	
	Dithiothreitol	40 mM
Sammelgel (4%)	Acrylamid	4% (m/V)
	bis-Acrylamid	0.2% (m/V)
	Tris	125 mM
	SDS	0.1% (m/V)
	TEMED	0.064% (V/V)
	Ammoniumpersulfat	0.1% (m/V)
	pH 6.8	
Trenngel (10%)	Acrylamid	10% (m/V)
	bis-Acrylamid	0.5% (m/V)
	Tris	100 mM
	Glycin	300 mM
	EDTA	60 μ M
	SDS	0.1% (m/V)
	Glycerol	13.3% (V/V)
	Polyacrylamid	0.2% (m/V)
	TEMED	0.086% (V/V)
	Ammoniumpersulfat	0.04% (m/V)
	pH 8.8	
Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	Tris	50 mM
	Glycin	125 mM
	SDS	1% (m/V)
	pH 8.8	
Proteingrößenstandard (Amersham Biosciences, Freiburg)	Phosphorylase b	97 kDa
	Albumin	66 kDa
	Ovalbumin	45 kDa
	Carboanhydrase	30 kDa
	Trypsininhibitor	20.1 kDa
	α -Lactalbumin	14.4 kDa
Transferpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	42 mM
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	8 mM

Ponceau S-Lösung	Ponceau S Trichloressigsäure Sulfosalicylsäure	0.2% 3% 3%
Puffer A	Tris NaCl pH 7.4	13 mM 154 mM
Puffer C	Tris NaCl Tween 20 pH 7.4	13 mM 154 mM 0.1% (V/V)
TBS pH 9.4	Tris NaCl pH 9.4	10 mM 154 mM
AP-Puffer	NaCl MgCl ₂ x 6H ₂ O Triethanolamin pH 9.4	100 mM 5 mM 100 mM
BCIP-Stammlösung	BCIP in Dimethylformamid	5% (m/V)
NBT-Stammlösung	NBT Dimethylformamid In A. bidest.	5% (m/V) 70% (V/V)

Albumin aus Rinderserum	Sigma, Steinheim
BCIP	Biomol, Hamburg
Biorad Protein Assay Reagenz	Biorad Laboratories, München
Cellophan®-Papier	Biorad Laboratories, München
ECF-Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg
Leupeptin	Sigma, Steinheim
NBT	Sigma, Steinheim
Ponceau-S-Lösung (10 x konzentriert)	Sigma, Steinheim
Protran Nitrocellulose Membran BA 85	Schleicher und Schuell, Dassel

Arbeitstechniken mit DNA

LB-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl pH 7.5 autoklavieren	1% (m/V) 0.5% (m/V) 0.5% (m/V)
LB-Agar	Agar-Agar in LB-Medium pH 7.5	1.5% (m/V)
CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂ sterilfiltrieren (Membranfilter Porengröße 0.22µm)	100 mM
Waschpuffer (elektrocomp. E. coli)	Glycerol bidest. Wasser autoklavieren	10 % (V/V) 90 % (V/V)
SOC-Medium	Hefeextrakt Trypton NaCl KCl MgCl ₂ x 6H ₂ O Glucose x H ₂ O pH 7.0 autoklavieren	0.5% (m/V) 2% (m/V) 8.5 mM 2.5 mM 10 mM 20 mM
Puffer P1 (Resusp.puffer)	Tris-HCl pH 8.0 EDTA RNase A Lagerung bei 2 bis 8°C (Grund: RNase-Stabilität)	50 mM 10 mM 100 µg/ml
Puffer P2 (Lysispuffer)	NaOH SDS	200 mM 1% (m/V)
Puffer P3 (Neutralis.puffer)	Kaliumacetat pH 5.5	3 M
10 x Probenpuffer Bromphenolblau (DNA-Gelelektrophorese)	q. s. Glycerol 1 x TAE	50% (V/V) 50% (V/V)

TAE-Puffer	Tris Essigsäure Na-EDTA pH 8.0	40 mM 0.11% (V/V) 1. mM
TE/SDS-Puffer	Tris EDTA SDS pH 8.0	50 mM 100 mM 0.5% (V/V)
Proteinase K-Lsg.	Proteinase K	1% (m/V)
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim	
Blockingreagenz	Roche, Mannheim	
Dithiothreitol (DTT)	CN Biomedicals Inc., Aurora, USA	
dNTP-Stamm, 20 mM	AGS, Heidelberg	
ECF-Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg	
Ethidiumbromid 1%ig in H ₂ O	Merck, Darmstadt	
GenScreen (Art.Nr.: NEF 983)	NEN-DuPont, Bad Homburg	
Hefeextrakt	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg	
Invisorb DNA Extraction Kit	Invitrogen, Karlsruhe	
Oligo(dt)-Primer p(dt)15	Roche, Mannheim	
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Heidelberg	
RNase Qiagen,	Qiagen, Hilden	
RNase-Inhibitor	AGS, Heidelberg	
Trypton/Peptone 140	Gibco BRL/Life Technol., Karlsruhe	
Tween-20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn	
T4-Ligase	Roche, Mannheim	

Bestimmung der Phosphataseaktivität

Homogenisationspuffer II	Tris-HCl EGTA EDTA 2-Mercaptoethanol pH 7.4 vor Gebrauch frisch zusetzen: Benzamidin PMSF	20 mM 2 mM 5 mM 0.1% (V/V)
Puffer M1	EDTA 2-Mercaptoethanol pH 7.0	5 mM 0.1% (V/V)

Puffer M2	EDTA 2-Mercaptoethanol HEPES pH 7.0	5 mM 0.1% (V/V) 50 mM
Phosphorylase-Kinase-Lsg.	Tris MgCl ₂ Benzamidin CaCl ₂ BSA Phosphorylase b Phosphorylase-Kinase ATP γ-[³² P]-ATP	50 mM 20 mM 31 mM 1 mM 0.66 mg/ml 5 mg/ml 20 IE/ml 1 mM 1 mCi
Dialysierpuffer	Tris EDTA pH 7.4	10 mM 1 mM
Phos. α-Reaktionsansatz	Tris Coffein EDTA 2-Mercaptoethanol [³² P]-Phosphorylase α pH 7.4	20 mM 5 mM 0.1 mM 0.1% 25%
γ-[³² P]-ATP Benzamidin Coffein Dialyseschlauch Servapor p-Nitrophenylphosphat Okadasäure Phosphorylase b Phosphorylase-Kinase PP1α (rec. aus <i>E. coli</i>)	NEN-DuPont, Bad Homburg Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Serva Electrophoresis, Heidelberg Sigma, Steinheim ICN Biomedicals, Eschwege Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim	

Das adenovirale Expressionssystem

HEK-Medium	Fötale Kälberserum, inaktiviert Penicillin G Streptomycinsulfat L-Glutamin in DMEM (s. u.: Sigma, D-5671) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	10% (V/V) 100 IU/ml 100 µg/ml 4 mM
DMEM (15% FCS)	Fötale Kälberserum, inaktiviert in DMEM (s. u.: Sigma, D-5671) sterilfiltrieren (Porengröße 0.2 µm)	15% (V/V)
0.15% Collagen	Collagenlösung (Worthington) in PBS pH 7.45	15% (V/V)
Kryokonservierungsmedium	FCS DMSO	95% (V/V) 5% (V/V)
Collagen bovine achilles tendon fötale Kälberserum	Worthington, New Jersey, USA Gibco/Life Technologies, Karlsruhe vor der Verwendung hitzeinaktiviert (20 min, 50°C)	
L-Glutamin 200 mM Penicillin/Streptomycin-Lösung Pferdeserum	ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA Gibco/Life Technologies, Karlsruhe Gibco/Life Technologies, Karlsruhe vor der Verwendung hitzeinaktiviert (30 min, 56°C)	
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe	

8.2 Antikörper

Tab. 8.1.: Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen (pk = polyklonal, mk = monoklonal).

1. Antikörper	Verd.	2. Antikörper	Firma/Referenz
Anti- PP2A (pk)	1:1000	Anti-Kaninchen IgG-AP/ [¹²⁵ I]-Protein A	Upstate/Biomol, Hamburg
Anti- PP2A (C-20) (pk)	1:500	Anti-Ziege IgG-AP	St. Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA
Anti- PP1α (pk)	1:1000	Anti-Kaninchen IgG-AP	Upstate/Biomol, Hamburg
Anti- B56α (C-18)	1:1000	Anti-Ziege IgG-AP	St. Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA
Anti- Aα (C-20) (pk)	1:1000	Anti-Ziege IgG-AP	St. Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA
Anti- CSQ (pk)	1:1000	Protein A	MacDouglas et al. 1991
Anti- I₂ (mk)	1:1000	Anti-Maus IgG-AP	BD Transduction, Heidelberg

Die 2. Antikörper wurden von Sigma (Steinheim) bezogen.

8.3 Geräte und Bezugsquellen

Autoklav Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Autoklav Tuttnauer Systec Typ 3850 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Betazähler TRI-CARB 1600 TR	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Blotkammer Hoefer	Hoefer Scientific Instruments San Franc. USA
Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments San Franc. USA
Flatbed Recorder Kipp and Zonen	FMI, Seeheim/Ober-Beerlauch
Gefäßmyograph Modell 410 A	Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark
Geldokumentation Fluo_Link	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Gene Pulser	Biorad Laboratories, München
Inkubator Queue Stabil Therm	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Inkubator (Bakterienkultur) Typ UE 400	Memmert GmbH, Schwabach
Kühlbrutschrank Typ ICP 600	Memmert GmbH, Schwabach
Labor-Schwingmühle Mikro-Dismembrator U	B. Braun Biotech International AG, Melsungen
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop Labovert	FS Leitz, Wetzlar
PCR-Gerät Gene Amp ® PCR System 9700	PerkinElmer Analytical Instruments, Shelton, USA
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
PhosphorImager Kassetten	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Polytron PT-MR 3000	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Reinstwasseranlage TKA-LAB Typ HP4	TKA Wasseraufbereitungssysteme mbH, Niederelbert

Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttler Modell 3015	GFL, Burgwedel
Schüttler Modell Unimax 2010, RO-5	Heidolph GmbH, Schwabach
Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2472	Heraeus instruments, Düsseldorf
Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Szintillationszähler	Canberra Packard, Dreieich
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Modell 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Modell 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallstab VirSonic® 60	VirTis, New York, USA
UV-Lichtanlage Docu Gel-V 8A400	MWG Biotech, Ebersberg
Vakuumzentrifuge SpeedVac Plus AR Modell SC 110AR	Savant Instruments Inc., Farmingdale New York, USA
Zentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Universal 16	Hettich/Heraeus Holding, Düsseldorf
Zentrifuge Universal 16R	Hettich/Heraeus Holding, Düsseldorf
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding, Düsseldorf

8.4 Primer und PCR-Programme

In den folgenden Tabellen sind die Primer und PCR-Programme zur Amplifikation der verschiedenen Untereinheiten sowie die verwendeten Sequenzierungsprimer angegeben. Alle Primer sind in 5' – 3'- Orientierung geschrieben.

Tab. 8.3.1: Amplifikation von humanem PP1 Inhibitor-2 aus Plasmid-DNA (α-MHC::I₂)			
α -MHC for	GAC AGA GAA GCA GGC ACT TTA CAT GGA GTC		
PP1 I-2-rev	ACT ACA GGC ATC TTC ATC ATC CCC C		
Produktgröße	480 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	60 sec	95°C	35 Zyklen
Annealing	60 sec	53°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 8.3.2: Amplifikation von humanem PP1 Inhibitor-2 aus genomischer DNA der α-MHC-I₂-full length-Maus			
α -MHC for	GAC AGA GAA GCA GGC ACT TTA CAT GGA GTC		
PP1 I-2-rev	ACT ACA GGC ATC TTC ATC ATC CCC C		
Produktgröße	480 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	60 sec	95°C	35 Zyklen
Annealing	60 sec	53°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 8.3.3: Amplifikation von humanem PP1 Inhibitor-2 aus genomischer DNA der SM-MHC-I₂-Maus			
SM-MHC for	AAG TTC AGA AAA TCC CCT TTC C		
PP1 I-2-rev	ACT ACA GGC ATC TTC ATC ATC CCC C		
Produktgröße	850 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	45 sec	94°C	30 Zyklen
Annealing	60 sec	55°C	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	1 Zyklus

Tab. 8.3.4: Amplifikation der humanem A-Untereinheit der PP2A aus Plasmid-DNA (pCR 2.1::A α)

A-alpha_for	CTG ATT CAG GAA ACA GCT ATG AC		
A-alpha_rev	TGG GTA CCG ATA TCT GCA GAA TTC		
Produktgröße	2200 bp		
PCR-Programm:			
Denaturierung	5 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	95°C	35 Zyklen
Annealing	30 sec	53°C	
Elongation	90 sec	72°C	
Elongation	5 min	72°C	1 Zyklus

9. Literaturliste

- Ahmad Z, Green FJ, Subuhi HS and Watanabe AM (1989) Autonomic regulation of type 1 protein phosphatase in cardiac muscle. *J Biol Chem* 264: 3859-3863
- Agostinis P, Derua R, Sarno S, Goris J and Merlevede W (1992) Specificity of the polycation-stimulated (type-2A) and ATP,Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. *Eur J Biochem* 205: 241-248
- Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ and Nakano T (2001) Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch* 441(5): 596-603
- Balzer F (2004) Entwicklung von Modellsystemen zur Untersuchung der Funktion der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1 in der vaskulären glatten Muskulatur. Inaugural-Dissertation im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster
- 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
- Barker HM, Jones TA, da Cruz e Silva EF, Spurr NK, Sheer D and Cohen PT (1990) Localization of the gene encoding a type I protein phosphatase catalytic subunit to human chromosome band 11q13. *Genomics* 7: 159-166
- Bastians H and Ponstingl H (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci* 109 : 2865-2874
- Bayley PM, Findlay WA and Martin SR (1996) Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences. *Protein Sci* 5: 1215-1228
- Berndt N, Campbell DG, Caudwell FB, Cohen P, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OB and Cohen PT (1987) Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding a type-1 protein phosphatase catalytic subunit: homology with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 223: 340-346
- Beullens M, Van Eynde A, Vulsteke V, Connor J, Shenolikar S, Stalmans W and Bollen M (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1. *J Biol Chem* 274: 14053-14061
- Bialojan C, Ruegg JC and Takai A (1988) Effects of okadaic acid on isometric tension and myosin phosphorylation of chemically skinned guinea-pig taenia coli. *J Physiol* 398: 81-95
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
- Bishop JO (1996) Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reprod Nutr Dev* 36: 607-618

- Boknik P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Muller T, Schmitz W, Schroder F and Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 222-231
- Boknik P, Khorchidi S, Bodor GS, Huke S, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller FU, Schmitz W and Neumann J (2001) Role of protein phosphatases in regulation of cardiac inotropy and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H786-794
- Bollen M and Stalmans W (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 227-281
- Bollen M, DePaoli-Roach AA and Stalmans W (1994) Native cytosolic protein phosphatase-1 (PP-1S) containing modulator (inhibitor-2) is an active enzyme." *FEBS Lett* 344: 196-200
- Brewis ND, Street AJ, Prescott AR and Cohen PT (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *Embo J* 12: 987-996
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC and Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA and Kranias EG (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol* 22: 4124-35
- Charnet P, Lory P, Bourinet E, Collin T and Nargeot J (1995) cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac L-type Ca channel: a missing link? *Biochimie* 77: 957-962
- Chen MX, Chen YH and Cohen PT (1992) Polymerase chain reactions using *Saccharomyces*, *Drosophila* and human DNA predict a large family of protein serine/threonine phosphatases. *FEBS Lett* 306: 54-58
- Chen MX and Cohen PT (1997) Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett* 400: 136-40
- Cohen P (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508
- Cohen P, Schelling DL and Stark MJ (1989) Remarkable similarities between yeast and mammalian protein phosphatases. *FEBS Lett* 250: 601-606
- Cohen PT (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22: 245-251
- Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256
- Csortos C, Zolnierowicz S, Bako E, Durbin SD and DePaoli-Roach AA (1996) High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A0. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *J Biol Chem* 271: 2578-2588

- 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
- Dillon N and Festenstein R (2002) Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18: 252-258
- Di Virgilio F, Steinberg TH, Swanson JA and Silverstein SC (1988) Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions. *J Immunol* 140: 915-920
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH and Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7: 555-569
- Duthe F, Plaisance I, Sarrouilhe D and Herve JC (2001) Endogenous protein phosphatase 1 runs down gap junctional communication of rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1648-1656
- Ebersole BJ, Diglio CA, Kaufman DW and Berg KA (1993) 5-Hydroxytryptamine₁-like receptors linked to increases in intracellular calcium concentration and inhibition of cyclic AMP accumulation in cultured vascular smooth muscle cells derived from bovine basilar artery. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 692-699
- Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P and Barford D (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254: 942-959
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P and Barford D (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 16: 1876-1887
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J and Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J* 17: 437-439
- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B and Shenolikar S (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35: 5220-5228
- Erdödi F, Ito M, Hartshorne DJ (1996) Myosin light chain phosphatase. In: Barany M (ed) *Biochemistry of smooth muscle contraction*. Academic Press, San Diego: 131-142
- Eto M, Wong L, Yazawa M and Brautigan DL (2000) Inhibition of myosin/moesin phosphatase by expression of the phosphoinhibitor protein CPI-17 alters microfilament organization and retards cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 46: 222-234
- Eto M, Kitazawa T and Brautigan DL (2004) Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8888-8893

- Everett AD, Kamibayashi C and Brautigan DL (2002) Transgenic expression of protein phosphatase 2A regulatory subunit B56gamma disrupts distal lung differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1266-1271
- Fabiato A and Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249: 469-495
- Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P and Hemmings BA (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem* 269: 16311-16317
- Fenton RA, Dickson EW and Dobson JG Jr. (2005) Inhibition of phosphatase activity enhances preconditioning and limits cell death in the ischemic/reperfused aged rat heart. *Life Sci*
- Fourel G, Lebrun E and Gilson E (2002) Protosilencers as building blocks for heterochromatin. *Bioessays* 24: 828-835
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W and Neumann J (2004) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-40834
- Gershoni JM (1988) Protein blotting: a manual. *Methods Biochem Anal* 33: 1-58
- Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P and Bristow MR (1996) Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 94: 2817-2825
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC and Kuriyan J (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376: 745-753
- Green DD, Yang SI and Mumby MC (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4880-4884
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA and 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
- Gryniewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J and Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185
- Guo H and Damuni Z (1993) Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2500-2504
- Guo H, Reddy SA and Damuni Z (1993) Purification and characterization of an autophosphorylation-activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268: 11193-11198

- Guo Z, Su W, Ma Z, Smith GM and Gong MC (2003) Ca^{2+} -independent phospholipase A2 is required for agonist-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 278: 1856-1863
- Gupta RC, Yang XP, Mishra S and Sabbah HN (2003) Assessment of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -uptake during the development of left ventricular hypertrophy. *Biochem Pharmacol* 65: 933-939
- Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O and Sabbah HN (2003) Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2373-2381
- Hartshorne DJ, Ito M and Erdodi F (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 325-341
- Hartshorne DJ and Hirano K (1999) Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem* 190: 79-84
- Hartshorne DJ, Ito M and Erdodi F (2004) Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem* 279: 37211-37214
- Hastie CJ and Cohen PT (1998) Purification of protein phosphatase 4 catalytic subunit: inhibition by the antitumour drug fostriecin and other tumour suppressors and promoters. *FEBS Lett* 431: 357-361
- Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Muller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J and Stone SR (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry* 29: 3166-3173
- Hendrix P, Mayer-Jackel RE, Cron P, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W and Hemmings BA (1993) Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J Biol Chem* 268: 15267-15276
- Hendrix P, Turowski P, Mayer-Jaekel RE, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W and Hemmings BA (1993b) Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and Xenopus. *J Biol Chem* 268: 7330-7337
- Henikoff S (2000) Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470: O1-8
- Hennig W (1999) Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9
- Herzig S and Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210
- Honkanen RE (1993) Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett* 330: 283-286
- Huang X and Honkanen RE (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *J Biol Chem* 273: 1462-1468

- Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P and Nairn AC (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 274: 7870-7878
- Ingebritsen TS and Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338
- Ingebritsen TS, Stewart AA and Cohen P (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem* 132: 297-307
- Jagiello I, Beullens M, Stalmans W and Bollen M (1995) Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 270: 17257-17263
- Janssens V and Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353: 417-439
- Johnson JD, Snyder C, Walsh M and Flynn M (1996) Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca²⁺ exchange with the N- and C-terminal Ca²⁺ binding sites of calmodulin. *J Biol Chem* 271: 761-767
- Johnson D, Cohen P, Chen MX, Chen YH and Cohen PT (1997) Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem* 244: 931-939
- Kakinoki Y, Somers J and Brautigan DL (1997) Multisite Phosphorylation and the Nuclear Localization of Phosphatase Inhibitor 2-Green Fluorescent Protein Fusion Protein during S Phase of the Cell Growth Cycle. *J Biol Chem* 272: 32308-32314
- Kamibayashi C, Lickteig RL, Estes R, Walter G and Mumby MC (1992) Expression of the A subunit of protein phosphatase 2A and characterization of its interactions with the catalytic and regulatory subunits. *J Biol Chem* 267: 21864-21872
- Kao JP (1994) Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. *Methods Cell Biol* 40: 155-181
- Kim YM, Watanabe T, Allen PB, Lee SJ, Greengard P, Nairn AC and Kwon YG (2003) PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 13819-13828
- Kimes BW and Brandt BL (1976) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* 98: 349-366
- Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Bruchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, Depaoli-Roach AA and Neumann J (2005) Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* 68: 98-108
- Kitamura K, Mizuno Y, Sasaki A, Yasui A, Tsuiki S and Kikuchi K (1991) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for the catalytic subunit 1 alpha of rat kidney type 1 protein phosphatase, and detection of the gene expression at high levels in hepatoma cells and regenerating livers as compared to rat livers. *J Biochem (Tokyo)* 109: 307-310

- Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP and Brautigan DL (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 275: 9897-9900
- Knapp J, Boknik P, Linck B, Laer S, Muller FU, Neumann J, Vahlensieck U, Schluter H, Zidek W and Schmitz W (1999) Inositol-1,4,5-trisphosphate increase by diadenosine tetraphosphate in preparations from failing human myocardium. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 360: 354-357
- Kotlikoff ML, Wang YX, Xin HB and Ji G (2002) Calcium release by ryanodine receptors in smooth muscle. *Novartis Found Symp* 246: 108-119; discussion 119-124, 221-227
- Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N and Walter G (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
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lee JA, Takai A and Allen DG (1991) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, increases the calcium transients in isolated ferret ventricular muscle. *Exp Physiol* 76: 281-284
- Li L, Eto M, Lee MR, Morita F, Yazawa M and Kitazawa T (1998) Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. *J Physiol* 508 : 871-881
- Li X and Virshup DM (2002) Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem* 269: 546-552
- Li X, Huang CX, Jiang H, Cao F and Wang T (2005) The beta-adrenergic blocker carvedilol restores L-type calcium current in a myocardial infarction model of rabbit. *Chin Med J (Engl)* 118: 377-382
- Li YM, Mackintosh C and Casida JE (1993) Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues. *Biochem Pharmacol* 46: 1435-1443
- Lindemann JP and Watanabe AM (1985) Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 260: 4516-4525
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Luss H, Klein-Wiele O, Boknik P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Muller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W and 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
- MacDougall LK, Jones LR and Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196: 725-734

- Marks AR (2001) Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol* 33: 615-624
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N and Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-376
- McAvoy T, Allen PB, Obaishi H, Nakanishi H, Takai Y, Greengard P, Nairn AC and Hemmings HC Jr (1999). Regulation of neurabin I interaction with protein phosphatase 1 by phosphorylation. *Biochemistry* 38: 12943-12949
- McCright B and Virshup DM (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem* 270: 26123-26128
- McCright B, Rivers AM, Audlin S and Virshup DM (1996a) 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
- McCright B, Brothman AR and Virshup DM (1996b) Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes b56alpha, b56beta, b56gamma, b56delta, and b56epsilon (PPP2R5A-PPP2R5E), highly expressed in muscle and brain, to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2 --> p12. *Genomics* 36: 168-170
- McLennan DJ and Wong RJ (1970) The mechanism of the chloride ion-promoted dehydrochlorination of DDT and ring-substituted analogues in acetone. *Tetrahedron Lett* 11: 881-884
- Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG and Sabbah HN (2002) Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant* 21: 366-373
- Mitchell RD, Simmerman HK and Jones LR (1988) Ca²⁺ binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 263: 1376-1381
- Morano IL (1992) Molecular biology of smooth muscle. *J Hypertens* 10: 411-416
- Mumby MC and Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73: 673-699
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC and Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457
- Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC and Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265: H257-266
- Neumann J, Herzig S, Boknik P, Apel M, Kaspareit G, Schmitz W, Scholz H, Tepel M and Zimmermann N (1995) On the cardiac contractile, biochemical and electrophysiological effects of cantharidin, a phosphatase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 530-539

- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H and Zimmermann N (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-272
- Neumann J, Boknik P, DePaoli-Roach AA, Field LJ, Rockman HA, Kobayashi YM, Kelley JS and Jones LR (1998) Targeted overexpression of phospholamban to mouse atrium depresses Ca^{2+} transport and contractility. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1991-2002
- Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A and Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 68: 1742-1750
- Niuro N, Koga Y and Ikebe M (2003) Agonist-induced changes in the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase and CPI17, two regulatory factors of myosin light chain phosphatase, in smooth muscle. *Biochem J* 369: 117-128
- Nomura M, Stull JT, Kamm KE and Mumby MC (1992) Site-specific dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemistry* 31: 11915-11920
- Onishi H, Umeda J, Uchiwa H and Watanabe S (1982) Purification of gizzard myosin light-chain phosphatase, and reversible changes in the ATPase and superprecipitation activities of actomyosin in the presence of purified preparation of myosin light-chain phosphatase and kinase. *J Biochem (Tokyo)* 91: 265-271
- Pallas DC, Weller W, Jaspers S, Miller TB, Lane WS and Roberts TM (1992) The third subunit of protein phosphatase 2A (PP2A), a 55-kilodalton protein which is apparently substituted for by T antigens in complexes with the 36- and 63-kilodalton PP2A subunits, bears little resemblance to T antigens. *J Virol* 66: 886-893
- Park IK, Roach P, Bondor J, Fox SP and DePaoli-Roach AA (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J Biol Chem* 269: 944-954
- Park IK and AA DePaoli-Roach (1994b) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* 269: 28919-28928
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajar RJ and Kranias EG (2005) Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res* 96: 756-766
- Pearson RB, Floyd DM, Hunt JT, Lee VG and Kemp BE (1988) Hydroxyamino acid specificity of smooth muscle myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys* 260: 37-44
- Pearson RB, Wettenhall RE, Means AR, Hartshorne DJ and Kemp BE (1988) Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase. *Science* 241: 970-973

- Picking WD, Kudlicki W, Kramer G, Hardesty B, Vandenheede JR, Merlevede W, Park IK and DePaoli-Roach A (1991) Fluorescence studies on the interaction of inhibitor 2 and okadaic acid with the catalytic subunit of type 1 phosphoprotein phosphatases. *Biochemistry* 30: 10280-10287
- Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter FJ and Spieckermann PG (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 14: 397-412
- Porzio MA and Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490: 27-34
- Rampazzo A, Nava A, Erne P, Eberhard M, Vian E, Slomp P, Tiso N, Thiene G and Danieli GA (1995) A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 4: 2151-2154
- Rapundalo ST (1998) Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-588
- Regan CP, Manabe I and Owens GK (2000) Development of a smooth muscle-targeted cre recombinase mouse reveals novel insights regarding smooth muscle myosin heavy chain promoter regulation. *Circ Res* 87: 363-369
- Rhoads AR and Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* 11: 331-340
- Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P and Doetschman T (1990) Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem* 265: 11905-11909
- Ross G, Engel P, Abdallah Y, Kummer W and Schluter KD (2005) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues: a new mediator of cardiac function via nitric oxide production in the rat heart. *Endocrinology* 146: 2221-2228
- Ruediger R, Roeckel D, Fait J, Bergqvist A, Magnusson G and Walter G (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol* 12: 4872-4882
- Ruediger R, Fields K and Walter G (1999) Binding specificity of protein phosphatase 2A core enzyme for regulatory B subunits and T antigens. *J Virol* 73: 839-842
- Salih V, Greenwald SE, Chong CF, Coumbe A and Berry CL (1992) The development of an in-vitro perfusion system for studies on cultured cells. *Int J Exp Pathol* 73: 625-632
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage
- Sangrador A, Andres I, Eguiraun A, Lorenzo ML and Ortiz JM (1998) Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet* 259: 449-456
- Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T and Nagao M (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81: 1272-1280

- Sham JS, Cleemann L and Morad M (1995) Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 121-125
- Shenolikar S and Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23: 1-121
- Shima H, Hatano Y, Chun YS, Sugimura T, Zhang Z, Lee EY and Nagao M (1993) Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 1289-1296
- Shirazi A, Iizuka K, Fadden P, Mosse C, Somlyo AP, Somlyo AV and Haystead TA (1994) Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* 269: 31598-31606
- Simmerman HK and Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947
- Sobieszek A, Borkowski J and Babiychuk VS (1997) Purification and characterization of a smooth muscle myosin light chain kinase-phosphatase complex. *J Biol Chem* 272: 7034-7041
- Solaro RJ, Holroyde MJ, Herzig JW and Peterson J (1980) Cardiac relaxation and myofibrillar interactions with phosphate and vanadate. *Eur Heart J Suppl A*: 21-27
- Somlyo AP and Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236
- Somlyo AP and Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 : 177-185
- Stone SR, Hofsteenge J and Hemmings BA (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 26: 7215-7220
- Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J and Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620
- Subramaniam A, Gulick J, Neumann J, Knotts S and Robbins J (1993) Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 268: 4331-4336
- Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ and Walsh MP (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 522 Pt 1: 33-49
- Sward K, Mita M, Wilson DP, Deng JT, Susnjar M and Walsh MP (2003) The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Curr Hypertens Rep* 5: 66-72
- Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Eugen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J Am Chem Soc* 103: 2469-2471

- Tani E (2002) Molecular mechanisms involved in development of cerebral vasospasm. *Neurosurg Focus* 12: ECP1
- Tehrani MA, Mumby MC and Kamibayashi C (1996) Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J Biol Chem* 271: 5164-5170
- Toraason M, Luken ME, Breitenstein M, Krueger JA and Biagini RE (1989) Comparative toxicity of allylamine and acrolein in cultured myocytes and fibroblasts from neonatal rat heart. *Toxicology* 56: 107-117
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
- Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290: 527-528
- Virshup DM (2000) Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* 12: 180-185
- Vogelstein B and Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-619
- Wallenstein S, Zucker CL and Fleiss JL (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9
- Wang QM, Park IK, Fiol CJ, Roach PJ and DePaoli-Roach AA (1994) Isoform differences in substrate recognition by glycogen synthase kinases 3 alpha and 3 beta in the phosphorylation of phosphatase inhibitor 2. *Biochemistry* 33: 143-147
- Waurick R, Knapp J, Van Aken H, Boknik P, Neumann J and Schmitz W (1999) Effect of 2,3-butanedione monoxime on force of contraction and protein phosphorylation in bovine smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 484-492
- Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV and Downey JM (1998) Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation* 98: 899-905
- Wera S and Hemmings BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311: 17-29
- Xie H and Clarke S (1994) Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *J Biol Chem* 269: 1981-1984
- Yang J, Hurley TD and DePaoli-Roach AA (2000) Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem* 275: 22635-22644
- Yao A, Kohmoto O, Oyama T, Sugishita Y, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Komuro I, Nagai R, Matsuo H, Serizawa T, Maruyama T and Takahashi T (2003) Characteristic effects of alpha1-beta1,2-adrenergic blocking agent, carvedilol, on $[Ca^{2+}]_i$ in ventricular myocytes compared with those of timolol and atenolol. *Circ J* 67: 83-90

- Yasumura Y, Takemura K, Sakamoto A, Kitakaze M and Miyatake K (2003) Changes in myocardial gene expression associated with beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 9: 469-474
- Yoshida K, Watanabe M, Kato H, Dutta A and Sugano S (1999) BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Lett* 460: 93-98
- Zhang XQ, Moore RL, Tenhave T and Cheung JY (1995) $[Ca^{2+}]_i$ transients in hypertensive and postinfarction myocytes. *Am J Physiol* 269: C632-640
- Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Gsell S, Jones LR, Maas R, Neumann J and Scholz H (1996) Mechanisms of the contractile effects of 2,3-butanedione-monoxime in the mammalian heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 431-436
- Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC and DePaoli-Roach AA (1994) Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry* 33: 11858-11867

Kongressbeiträge:

- Krause T, Aleth S, Balzer F, Schmitz W, Neumann J (2003) Altered expression of cardiac PP2A in patients with end-stage heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (supp 1): R96
- Brüchert N, Balzer F, Boknik P, Krause T, Hafer L, Kirchhefer U, Schmitz W, Neumann J. (2003) Adenoviral expression of PP1-I2. A new strategy against increased protein phosphatases in heart failure? *Circulation*. 381:IV-81
- Grote S, Krause T, Buchwalow I, Balzer F, Schmitz W, Neuman J (2004) Evidence for involvement of PP1 in smooth muscle contractility. *Circulation* 110: III-225

DANKSAGUNG

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. med. W. Schmitz für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und für die gute Betreuung während der Erarbeitung der Dissertation, insbesondere für die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit,

Frau Prof. Dr. H. Fink für die freundliche Übernahme der naturwissenschaftlichen Betreuung und das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse,

Frau Dr. rer. nat. Stefanie Grote und Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die intensive Betreuung der experimentellen Arbeiten, die kritische Durchsicht des Manuskripts und für das freundschaftliche Arbeitsklima,

allen Kolleginnen und Kollegen für ihre freundliche Unterstützung und Hilfe sowie für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima,

herzlichst meinen Eltern, meinem Bruder Alexander, meinem besten Freund Mirko, der gesamten Tierarztpraxis Dr. Bernick und allen Freunden, die mich in der Zeit der Promotion begleitet haben und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Selbständigkeitserklärung

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

Coesfeld, den

.....
Thorsten Krause