



**Die Bedeutung von Phospholamban-Pentameren für die  
Phospholamban-Phosphorylierung und die Regulation der  
SERCA2a-Aktivität**

**The role of phospholamban pentamers for phospholamban  
phosphorylation and regulation of SERCA2a activity**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades,  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Biomedizin

vorgelegt von

**Tanja Wittmann**

aus

VS-Villingen

Würzburg 2014

## **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled The role of phospholamban pentamers for phospholamban phosphorylation and regulation of SERCA2a activity is the result of my own work. I did not receive any help or support of commercial consultants. All sources and/ or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation mit dem Thema Die Bedeutung von Phospholamban-Pentameren für die Phospholamban-Phosphorylierung und die Regulation der SERCA2a-Aktivität eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Eingereicht am: .....

Mitglieder des Promotionskomitees:

**Vorsitzende/r:** Prof. Dr. Utz Fischer

**1. Betreuer:** Prof. Dr. Joachim P. Schmitt

**2. Betreuer:** Prof. Dr. Martin J. Lohse

**3. Betreuer:** Prof. Dr. Manfred Gessler

Tag des Promotionskolloquiums: 19.12.2014

Doktorurkunden ausgehändigt am:

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Relaxationsphase im Herzen.....	1
1.2	SERCA2a – Kalzium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum.....	3
1.3	Phospholamban (PLN) - Regulator der SERCA2a .....	9
1.4	Struktur des PLN-Proteins .....	9
1.5	PLN-Phosphorylierung.....	12
1.6	Funktion von PLN-Monomer und -Pentamer.....	13
1.6.1	Die Aufgabe des PLN-Monomers .....	13
1.6.2	Die Aufgabe des PLN-Pentamers.....	14
1.7	Dephosphorylierung von PLN mit PP1 .....	15
1.8	Interaktion zwischen SERCA2a und PLN.....	16
1.9	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Zellkultur.....	23
2.1.2	Fertiglösungen/ Kits.....	23
2.1.3	Antikörper .....	24
2.1.4	Höhenmarker.....	25
2.1.5	Primer.....	26
2.1.6	Enzyme für Klonierung .....	28
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.8	Geräte .....	31
2.1.9	Software .....	32
2.2	Lösungen und Puffer.....	32
2.2.1	für Klonierung .....	32
2.2.2	für Transfektion, Kultivierung und Kryokonservierung.....	34
2.2.3	für die Zellyse .....	35

---

2.2.4	für Western Blot.....	35
2.2.5	für Rohmembranpräparation.....	38
2.2.6	für NADH-abhängige, enzymgekoppelte SERCA2a-Aktivitätsmessung .....	38
2.2.7	für Co-Immunpräzipitation .....	39
2.3	Methoden.....	41
2.3.1	Klonierung von Phospholamban-Mutanten .....	41
2.3.2	Generierung und Transformation kompetenter Bakterien .....	43
2.3.3	Kultivierung und Pflege von HEK293AD- und HEK293T-Zellen .....	44
2.3.4	Transfektion von HEK293AD- und HEK293T-Zellen.....	46
2.3.5	Lysieren der HEK293AD-Zellen.....	49
2.3.6	SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	50
2.3.7	Western blot.....	53
2.3.8	Tierexperimente (Mäuse).....	55
2.3.9	Rohmembranpräparation aus transfizierten HEK293AD-Zellen .....	57
2.3.10	NADH-abhängiges enzymgekoppeltes SERCA2a-Aktivitätsexperiment .....	57
2.3.11	Immunpräzipitation (IP) mit Dynabeads® Protein A oder Protein G .....	60
3	Ergebnisse .....	62
3.1	Identifizierung der für die PLN-Oligomerisierung verantwortlichen Aminosäuren ....	62
3.2	Sowohl PLN-Monomer als auch PLN-Pentamer stellen ein mögliches Zielprotein der PKA dar .....	70
3.3	Bestimmung von Gesamt-PLN und phosphoryliertem PLN.....	74
3.4	Die PKA-abhängige Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf das Gleichgewicht von PLN-Monomer und -Pentamer .....	80
3.5	Die Pentamer-Phosphorylierung im PLN-Protein erfolgt stufenweise.....	85
3.6	PLN-Pentamere verzögern die Phosphorylierung der PLN-Monomere .....	88
3.7	Unabhängige PLN-Mutanten bestätigen die Kinetik der Phosphorylierung von Wildtyp-PLN sowie AFA-PLN.....	93
3.8	Die PKA hat eine verstärkte PLN-Affinität in Anwesenheit der PLN-Pentamere .....	96
3.9	PLN-Pentamer und -Monomer binden an die Kalzium-ATPase SERCA2a.....	99
3.10	Das enzymgekoppelte, NADH-abhängige SERCA2a-Aktivitätsexperiment.....	105

---

3.11	Verminderte SERCA2a-Inhibition durch AFA-PLN in transgenen Mauserzen .....	111
3.12	Pentamere erhöhen die Regulationsmöglichkeit der SERCA2a .....	115
3.13	Phosphorylierungsmuster von PLN in transgenen Mäusen mit und ohne Pentamere .....	116
4	Diskussion .....	119
4.1	Der Cysteinrest in Position 41 des PLN ist kritisch für die Oligomerisierung .....	119
4.2	PLN-Pentamer wie -Monomer stellen ein mögliches Substrat der PKA dar.....	121
4.3	Das Monomer-Pentamer-Verhältnis bleibt nach PLN-Phosphorylierung stabil .....	123
4.4	Die Phosphorylierung der PLN-Pentamere verläuft stufenweise .....	125
4.5	Das Pentamer stellt das bevorzugte Phosphorylierungssubstrat der PKA dar .....	126
4.6	Sowohl PLN-Monomer wie auch -Pentamer interagieren mit der Kalzium- ATPase SERCA2a.....	128
4.7	In Anwesenheit der PLN-Pentamere ist die SERCA2a-Aktivität vermindert .....	130
4.8	Modell der PLN-SERCA2a-Regulation.....	131
5	Zusammenfassung .....	134
6	Abkürzungsverzeichnis.....	137
7	Literaturverzeichnis .....	139
8	Publikationsverzeichnis .....	148
9	Curriculum Vitae .....	149
10	Danksagung .....	151

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kalzium-Transportsysteme im Herzen.....	2
Abb. 2: Schematischer Aufbau der SERCA2a.....	5
Abb. 3: Regulationsmechanismus des SERCA2a-vermittelten SR-Kalziumrücktransports...	8
Abb. 4: Aufbau des PLN-Monomers.....	10
Abb. 5: Das Konformationsmodell von PLN. ....	11
Abb. 6: Dissoziations- und Untereinheiten-Modell der PLN-SERCA2a-Interaktion .....	17
Abb. 7: Prinzip der Protein-Trennung im <i>PhosTag</i> <sup>TM</sup> -SDS-Polyacrylamid-Gel.....	52
Abb. 8: PLN-Aminosäuresequenz .....	64
Abb. 9: Der Austausch der drei transmembranären Cysteine führt bei AFA-PLN zur ausschließlichen Expression von PLN-Monomeren. ....	65
Abb. 10: Die Punktmutation des transmembranären Cysteins an Position 41 trägt zur Aufhebung der PLN-Oligomerisierung bei.....	66
Abb. 11: PLN-L37A sowie PLN-I40A zeigten ausschließlich die Expression von PLN-Monomeren. ....	67
Abb. 12: Prozentuale Verteilung von Pentamer und Monomer für Wildtyp-PLN. ....	68
Abb. 13: Die Expression der bevorzugt Pentamer-bildenden Mutanten (PLN-I45A; PLN-V49A) zeigte ein ähnliches Monomer-Pentamer-Verhältnis wie Wildtyp-PLN. ....	69
Abb. 14: PLN-Pentamere wie auch -Monomere sind mögliche PKA-Substrate. ....	72
Abb. 15: Die Monomer-Phosphorylierung ist unter Abwesenheit des Pentamers verstärkt. ..	74
Abb. 16: Im <i>Western blot</i> -Experiment mit transfizierten HEK293AD-Zellen zeigten die zu überprüfenden Antikörper ihre spezifischen Erkennungscharakteristika .....	76
Abb. 17: Die steigende Anzahl an Phosphorylierungsbanden nach Forskolin-Stimulation bestätigte phospho-Antikörper-unabhängig die verstärkte PLN-Phosphorylierung. ..	78
Abb. 18: Testung der Antikörperspezifität in Maus-Kardiomyozyten mittels PP1 und Iso. ....	80
Abb. 19: Unveränderte PLN-Monomer-Pentamer-Verteilung nach PKA-abhängiger Phosphorylierung in transfizierten HEK293AD-Zellen. ....	82
Abb. 20: Stabiles Pentamer-Monomer-Verhältnis in Dobutamin- vs. nicht-Dobutamin-stimulierten Mausherzen.....	83
Abb. 21: Gleichbleibende Monomer-Pentamer-Verteilung in PLN-Mutanten mit veränderten Phosphorylierungsmuster. ....	85

---

Abb. 22: Die Pentamer-Phosphorylierung erfolgt stufenweise.....	88
Abb. 23: Kinetik der Phosphorylierung von Wildtyp-PLN-Mono- und -Pentameren. ....	91
Abb. 24: Bei der Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante verläuft die Kinetik der Phosphorylierung schneller.....	92
Abb. 25: Phosphorylierungs-Kinetik der PLN-I45A-Mutante. ....	94
Abb. 26: Phosphorylierungs-Kinetik der Monomer exprimierenden PLN-L37A-Mutante.....	95
Abb. 27: Die PKA hat eine hohe Affinität zu Wildtyp-PLN. ....	98
Abb. 28: PLN-Pentamere binden verstärkt an die Kalzium-ATPase SERCA2a.....	101
Abb. 29: Verminderte SERCA2a-Pentamer-Bindung nach $\beta$ -adrenerger Stimulation.....	103
Abb. 30: Dobutamin-Stimulation von Mausherzen löste die SERCA2a-Monomer-Bindung vollständig auf.....	104
Abb. 31: Reaktionsablauf des enzymgekoppelten, NADH-abhängigen SERCA2a-Aktivitäts-Experiments.....	106
Abb. 32: Nach SERCA2a-Hemmung mit TPG konnte kein weiterer NADH-Verbrauch gemessen werden. ....	107
Abb. 33: Thapsigargin inhibiert nicht die Apyrase .....	108
Abb. 34: Konzentrationsabhängigkeit der SERCA2a-Aktivitätsmessung.....	109
Abb. 35: Abhängigkeit der SERCA2a-Aktivität mit verschiedenen Mengen an Herz-Rohmembran.....	111
Abb. 36: Expression von PLN-Monomer und -Pentamer der verschiedenen transgenen Mauslinien. ....	112
Abb. 37: Erhöhte SERCA2a-Aktivität in Abwesenheit der PLN-Pentamere.....	114
Abb. 38: In Anwesenheit der PLN-Pentamere zeigte die SERCA2a-Aktivität nach $\beta$ -adrenerger Stimulation einen stärkeren Anstieg. ....	116
Abb. 39: Stärkere Zunahme der Monomer-Phosphorylierung in TgPLN als in TgAFA-PLN nach $\beta$ -adrenerger Stimulation der Mausherzen. ....	117
Abb. 40: Modell der molekularen Pentamer-Funktion.....	133

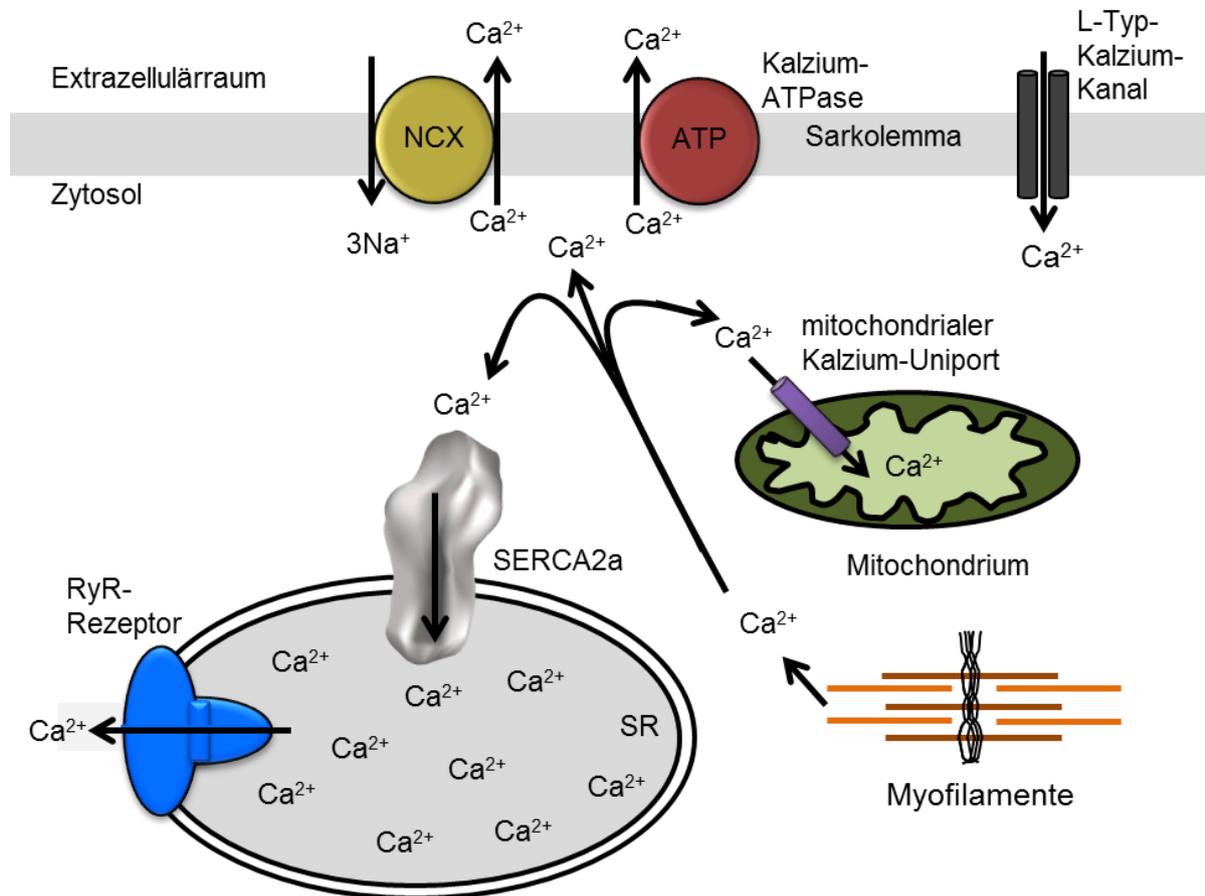
# 1 Einleitung

Kalzium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff in der Zellkommunikation. Transiente Erhöhungen der zytosolischen Kalziumkonzentration dienen der Regulation physiologischer Prozesse im Organismus. Im Herzen spielt Kalzium eine zentrale Rolle als Vermittler der elektromechanischen Kopplung. Ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt zur Kontraktion, ihr Abfall zur Relaxation des Herzmuskels. Somit stellt Kalzium das Bindeglied zwischen den elektrischen Signalen und der Kontraktion der Kardiomyozyten dar (Fearnley *et al.*, 2011).

## 1.1 Die Relaxationsphase im Herzen

Zur Relaxation des Herzmuskels und der damit verbundenen ventrikulären Blutfüllung muss das Kalzium, welches die Myofilamente zur Kontraktion aktivierte, vom Zytosol schnell entfernt werden. Hierfür sind vier Kalzium-Transportsysteme von Bedeutung, die SR-Kalzium-ATPase SERCA2a, das sarkolemmale NCX-System (Natrium-Kalzium-Austauscher), die sarkolemmale Kalzium-ATPase und der mitochondriale Kalzium-Uniporter. Dabei spielen die SR-Kalzium-ATPase SERCA2a sowie das NCX-System quantitativ die wichtigste Rolle (Bers, 2000) (**Abb. 1**). SERCA2a pumpt etwa 70 % des Kalziums aus dem Zytosol in das SR, wohingegen das NCX-System etwa 28 % des Kalziums über das Sarkolemma nach außen transportiert. Die Transportmenge der sarkolemmalen Kalzium-ATPase sowie des mitochondrialen Kalzium-Uniporters liegen zusammen bei ~ 2 %, somit ist hier eine Kapazitätenverteilung von 70 : 28 : 2 %. Diese Verteilung wurde von Bers *et al.* in Hasen-Myozyten gemessen und trifft in etwa auch für das Meerschweinchen, Frettchen und die humanen Kardiomyozyten zu. In Kardiomyozyten von Ratten und Mäusen hingegen ist die SERCA2a-Aktivität noch höher. Die Verteilung beläuft sich hier auf 92 : 7 : 1 % (Bassani *et al.*, 1994; Bers, 2000). Nach der Entfernung des zytosolischen Kalziums erreicht die Zelle

wieder ihre basale Ausgangssituation und steht bereit für eine erneute Erregung mit verbundener Kalziumausschüttung und Kontraktion (Shannon and Bers, 2004).



**Abb. 1: Kalzium-Transportsysteme im Herzen.**

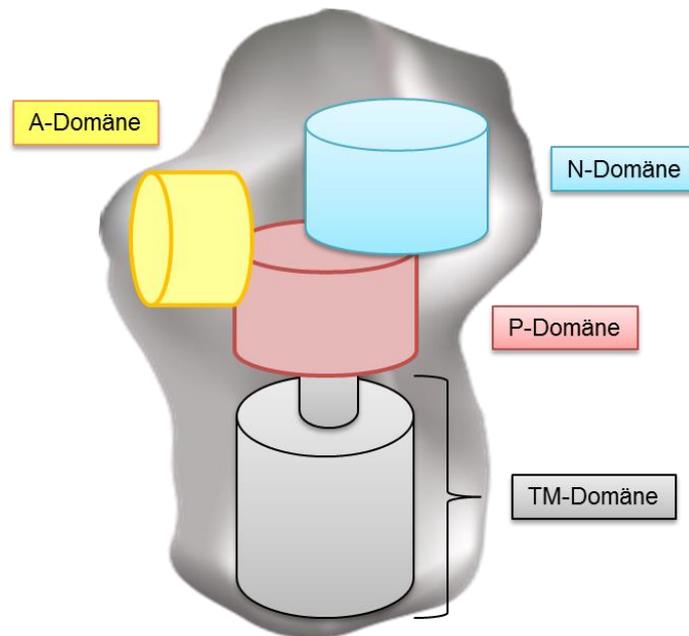
Schematische Darstellung der Kalzium-Transportsysteme im Herzen, die an der Systole (Kontraktion; Kalzium-Ausstrom aus dem SR ins Zytosol bzw. Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol) und der Diastole (Relaxation; Kalzium-Rücktransport ins SR, Mitochondrium sowie das Lumen) beteiligt sind. NCX, Natrium-Kalzium-Austauscher; SERCA2a, SR-Kalzium-ATPase; RyR-Rezeptor, Ryanodin-Rezeptor.

## 1.2 SERCA2a – Kalzium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum

Die membranständige Kalzium-ATPase SERCA (*sarco endoplasmic retikulum calcium ATPase*; Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums) stellt eine der wichtigsten Komponenten des kontraktiven Apparates im Herzen dar (Bers, 2008). Sie gehört zur Familie der P-Typ-ATPasen, zu der auch die Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPasen und H<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPasen gehören (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Sie gehört zu einer Protein-Familie, die durch drei hoch homologe Gene kodiert sind, SERCA1, SERCA2 und SERCA3 (Baker *et al.*, 1998). Die Klasse der SERCA2 teilt sich nochmals in drei verschiedene *splice*-Varianten SERCA2a, SERCA2b und SERCA2c. Diese drei Transkripte unterscheiden sich ausschließlich im C-Terminus des Proteins (Kranias and Hajjar, 2012). Dabei stellt die SERCA2a die bekannteste und phylogenetisch älteste Isoform dar (Wuytack *et al.*, 2002). SERCA2a wird hauptsächlich in Herzmuskelzellen und in langsamen Skelettmuskelfasern exprimiert und ist die wichtigste ATPase im Herzen. SERCA2b ist in der glatten Muskulatur von Erwachsenen sowie in nicht-muskulärem Gewebe zu finden. SERCA2c hingegen ist sowohl in kleineren Mengen im Herzmuskelgewebe als auch im nicht-muskulären Gewebe wie epithelialen, mesenchymalen und hämatopoetischen Zellen angesiedelt.

Die SERCA2a ist ein einzelnes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 110 kDa und ist in der Membran des SR angesiedelt (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Der zytosolische Bereich der SERCA2a macht mit etwa 75 % des gesamten Proteins den größten Teil aus. Das Protein unterteilt sich in drei Interaktionsbereiche, die Nukleotid-Bindungsdomäne (N-Domäne), die Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne) sowie die Aktivator-domäne (A-Domäne) (Wuytack *et al.*, 2002) (**Abb. 2**). In der N-Domäne wird das zur Phosphorylierung notwendige ATP gebunden. Die P-Domäne besitzt die konservierte Sequenz DKTGTLT mit einem wichtigen Aspartat, welches im Zyklus des Kalziumtransportes durch das gebundene ATP phosphoryliert und anschließend wieder dephosphoryliert wird (Kuhlbrandt, 2004). Die A-Domäne hat die Funktion der Übertragung

der Konformationsänderung während des Kalziumtransportzykluses. Der SR-transmembranäre Bereich wird durch zehn, große helikal angeordnete Segmente (M1 - M10) gebildet, wovon vier nebeneinandergestellt (M4, M5, M6, M8) die E2-Konformation bilden und den Bereich der Kalziumbindestellen formen (Wuytack *et al.*, 2002; Toyoshima and Inesi, 2004). Kleine Konformationsänderungen in diesem empfindlichen Bereich führen zum Kollabieren der Kalziumbindestellen (Akin *et al.*, 2013). Die beiden Kalziumbindestellen (I und II) der SERCA2a sind 5,7 Å voneinander entfernt und befinden sich in der gleichen Tiefe der SR-Membran (Toyoshima *et al.*, 2000). Die Kalziumbindestelle I ist zwischen Helix M6 und M5 angesiedelt, wohingegen die Bindestelle II zwischen Helix M6 und M4 lokalisiert ist.



**Abb. 2: Schematischer Aufbau der SERCA2a.**

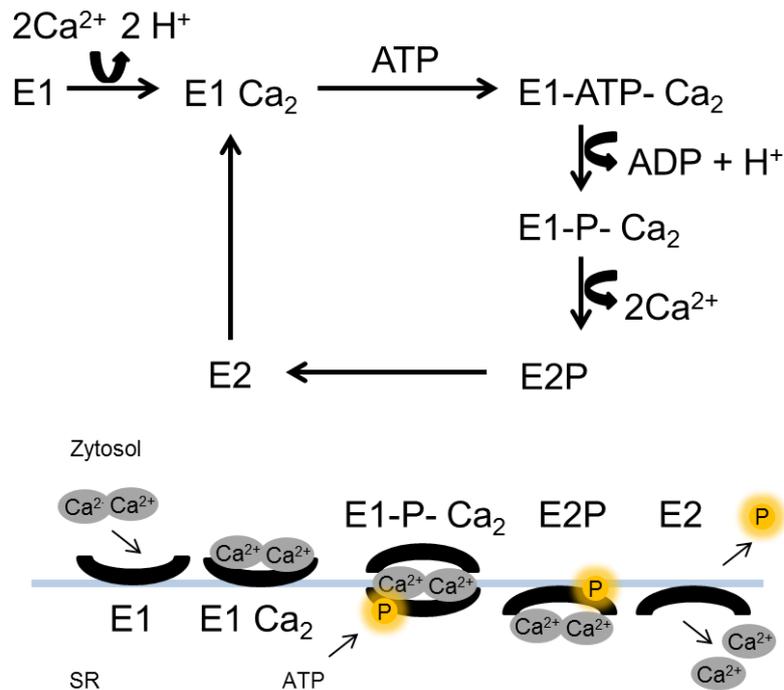
Die Kalzium-ATPase SERCA2a besteht aus drei zytosolischen Untereinheiten, die etwa 75 % des gesamten Proteins ausmachen. Die N-Domäne stellt die Nukleotid-Bindungsdomäne dar und ist für die Bindung des ATP, welches für die Phosphorylierung des Proteins notwendig ist, verantwortlich. Die P-Domäne ist die Phosphorylierungsdomäne, die das Aspartat beinhaltet, welches durch die Übertragung eines Phosphates, vom gebundenen ATP der N-Domäne, phosphoryliert wird. Die A-Domäne ist als Aktivator der Übermittler der Konformationsänderung während des Kalziumtransportes. Die transmembranäre Domäne (TM-Domäne) wird durch zehn helikal angeordnete Segmente (M1 - M10) gebildet, wovon vier parallel angeordnet die hoch affinen Kalziumbindestellen bilden (M4, M5, M6, M8).

Im Herzen kontrolliert die SERCA2a die Kinetik des Kalzium-Abtransports aus dem Zytosol sowie die Menge der Kalzium-Beladung des SR (Kranias and Hajjar, 2012). Damit ist die SERCA2a von zentraler Bedeutung für die Regulation der Kontraktion und Relaxation des Herzens. Die essentielle Rolle der SERCA2a in der Physiologie der Kalzium-Homöostase wurde in genetisch veränderten SERCA2a-Mäusen deutlich. Die Überexpression der SERCA2a in Herzmuskelzellen führte zu einem gesteigerten zytosolischen Kalzium-Abtransport sowie einer beschleunigten myokardialen Kontraktion und Relaxation (He *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1998; Vetter *et al.*, 2002). Bei den Tieren waren keine pathologischen Veränderungen zu erkennen und somit die Überexpression und gesteigerte Aktivität im

Herzen gut toleriert. Im Gegensatz zur Überexpression ist das Fehlen des SERCA2a-Gens letal. Homozygote SERCA2a-null- Mäuse (SERCA  $-/-$ ) starben schon in der frühen Entwicklungsphase (Periasamy *et al.*, 1999). Heterozygote (SERCA  $+/-$ ) Mäuse dagegen zeigten durch den Verlust des einen SERCA2a-Allels eine etwa 35 % verminderte SERCA2a-Proteinexpression, was sich in einer verminderten Kontraktionskraft der Myozyten und in einer geringeren SR-Kalzium-Beladung widerspiegelte (Schultz Jel *et al.*, 2004; Kranias and Hajjar, 2012). Obwohl unter basalen Bedingungen keine Pathophysiologie zu erkennen war, machte sich die verminderte SERCA2a-Expression in Kombination mit einer verstärkten hämodynamischen Belastung in einer beschleunigten Entstehung von Herzinsuffizienz bemerkbar (Schultz Jel *et al.*, 2004). Des Weiteren zeigten die heterozygoten Mäuse eine verschlechterte Kalziumhomöostase und verminderte Rate der kontraktilen Funktion, was darauf schließen lässt, dass beide funktionellen Kopien des SERCA2a-Gens für die Effizienz und Effektivität des Kalziumzyklus und die kardiale Pumpfunktion wichtig zu sein scheinen.(Periasamy *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 2000) In einer neueren Studie wurden erwachsene Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifisch induziert-ausschaltbarem SERCA2a-Gen (Atp2a2-Gen) untersucht (Andersson *et al.*, 2009). Dabei zeigten die Mäuse sieben Wochen nach Ausschaltung des Gens eine drastisch reduzierte diastolische Funktion mit 5-fach erhöhter Zeitkonstante des Druckabfalls. Nach weiteren vier Wochen zeigten die Tiere eine verminderte Expression des SERCA2a-Proteins auf unter 5 % im Herzgewebe. Überraschenderweise war die Herzfunktion zu diesem Zeitpunkt mäßig beeinträchtigt, was auf kompensatorische Mechanismen über das NCX-System zurückzuführen war. Anschließend stieg auf Grund zunehmender intrazellulärer Azidose in den Tieren die Mortalität drastisch an (Andersson *et al.*, 2009).

Eine wichtige Fähigkeit der P-Typ-ATPasen ist die Übertragung eines terminalen Phosphates von gebundenem ATP der N-Domäne auf ein Aspartat (D351) der P-Domäne (Toyoshima and Inesi, 2004; Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Diese ATP-Hydrolyse

und dadurch gewonnene Energie verwendet die ATPase für den Transport von zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Membran. Die SERCA2a transportiert während der Relaxationsphase im Herzen das überschüssige Kalzium aus dem Zytosol zurück an seinen Speicherort, das sarkoplasmatische Retikulum (SR), wo es anschließend für eine erneute Ausschüttung durch Erregung über den Ryanodin-Rezeptor (RyR-Rezeptor) bereit liegt. Die Kalzium-freie SERCA2a bindet dabei in einer spezifischen Konformation [E1] mit hoher Affinität der Reihe nach zwei zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an seine Kalziumbindestellen [CaE1], die wiederum  $\text{H}^+$ -Ionen ins Zytosol abgeben (Toyoshima and Inesi, 2004). Die Kalziumbindestellen der E1 sind dabei in Richtung des Zytosols gerichtet (Shareef *et al.*, 2014) (**Abb. 3**). Die Bindung des Kalziums an die SERCA2a ermöglicht im Anschluss die Phosphorylierung der Pumpe durch ATP, welches aus dem SR stammt [Ca<sub>2</sub>E1P] (Traaseth *et al.*, 2008). Durch die Phosphorylierung verändert die SERCA2a ihre Konformation, die mit der Freigabe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das SR-Lumen und einer gleichzeitigen Protonenaufnahme aus dem Zytosol einhergeht [E2P]. Die E2-Konformation hat eine geringere Kalzium-Affinität, weshalb die Kalziumbindestellen in Richtung SR-Lumen ausgerichtet sind (Shareef *et al.*, 2014) (**Abb. 3**). Die Hydrolyse des phosphorylierten Intermediates der SERCA2a [E2P] und die Regenerierung der Kalziumbindestellen vervollständigen den Reaktionszyklus (**Abb. 3**). SERCA2a liegt nach Regenerierung wieder in E1-Konformation vor und ist bereit für den nächsten Kalziumtransport (MacLennan and Green, 2000; MacLennan and Kranias, 2003; Stokes and Green, 2003; Toyoshima and Inesi, 2004).



**Abb. 3: Regulationsmechanismus des SERCA2a-vermittelten SR-Kalziumrücktransports.**

Eine Kalzium-freie SERCA2a [E1] bindet unter Abgabe von  $\text{H}^+$ -Ionen ins Zytosol zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [E1Ca<sub>2</sub>]. Die Kalziumbindung ermöglicht nun die Phosphorylierung der SERCA2a-Pumpe durch ATP zu [E1PCa<sub>2</sub>]. Nach Phosphorylierung ändert die SERCA2a unter Abgabe des Kalziums in das SR-Lumen seine Konformation [E2P]. Durch Hydrolyse des phosphorylierten SERCA2a-Intermediates sowie durch die Regenerierung der Kalziumbindestellen der Pumpe wird der Reaktionszyklus komplettiert.

Die dem Mechanismus zugrundeliegende Transportgleichung lautet demnach:



Es handelt sich also um einen elektrogenen  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -Antiport (Karjalainen *et al.*, 2007) bei dem 2  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins SR und 2  $\text{H}^+$ -Ionen ( $\text{H}^+$ -Ionen der ATP-Hydrolyse nicht mit einberechnet) ins Zytosol transportiert werden.

Die Pumpaktivität der SERCA2a wird durch das kleine membranständige Protein Phospholamban (PLN) reguliert.

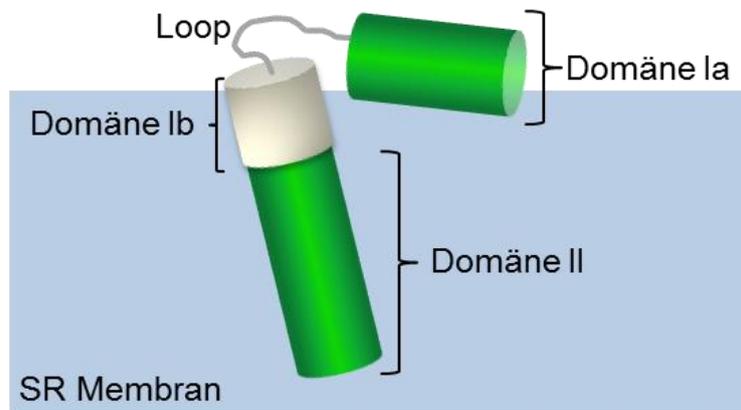
### 1.3 Phospholamban (PLN) - Regulator der SERCA2a

Phospholamban (PLN) ist ein kleines Protein, das in der Membran des SR im Herzen lokalisiert ist. Physiologisch kommen zwei verschiedene Formen von PLN im Herzen vor, Monomer und Pentamer. Das Pentamer wird durch verschiedene Wechselwirkungen im membranständigen Bereich stabilisiert. Zum einen durch die membranständigen Cysteine, C36, C41, C46 (Fujii *et al.*, 1989; MacLennan *et al.*, 1998) und zum anderen durch die Leucin-Isoleucin-Anordnungen, Leu37, Ile40, Leu44, Ile47, Leu51, den sogenannten „Leucin-Isoleucin-Zipper“, im transmembranären Bereich (Simmerman *et al.*, 1996). Im Pentamer sind die „Leucin-Isoleucin“-Zipper jeder transmembranären Helix symmetrisch dicht gepackt wodurch es seine stabile Konformation gewinnt (Simmerman *et al.*, 1996; Cornea *et al.*, 2000). Das Pentamer zerfällt im  $> 1\%$  SDS-PAGE nicht (Simmerman *et al.*, 1996) und kann durch Hitze oder den Zusatz von Detergenz wie Triton X-100 in fünf Monomere zerlegt werden (Le Peuch *et al.*, 1979; Wegener *et al.*, 1986). Mit 52 Aminosäuren (Fujii *et al.*, 1987) hat das Monomer in der SDS-PAGE und Western blot-Analyse eine Größe von 6,1 kDa, das Pentamer hingegen eine Größe von 22 kDa (MacLennan and Kranias, 2003). Des Weiteren besitzt PLN in der SDS-PAGE ein Konformationsmuster, das sich zwischen den Populationen, mit 10 - 20 % Monomer und 80 - 90 % Pentamer, aufteilt (Wegener and Jones, 1984; Jones *et al.*, 1985).

### 1.4 Struktur des PLN-Proteins

Das PLN-Protein hat eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus zwei Hauptdomänen: einer hydrophilen Domäne (Domäne I), die die drei Phosphorylierungsstellen (Ser10, Ser16, Thr17) des Proteins beinhaltet, und einer hydrophoben C-terminalen Domäne, die durch die SR-Membran hindurch reicht (Kranias and Hajjar, 2012). Die hydrophile Domäne (Aminosäure 1 - 30) wird in zwei weitere Subdomänen unterteilt: Domäne Ia hat in dephosphorylierter Form eine positive Ladung und besteht aus einer  $\alpha$ -Helix. Die Domäne Ib

wird hingegen als relativ unstrukturiert angenommen. Die hydrophobe Domäne (Domäne II; Aminosäure 31 - 52) bildet in der SR-Membran eine  $\alpha$ -Helix (MacLennan *et al.*, 1998; MacLennan *et al.*, 2002).

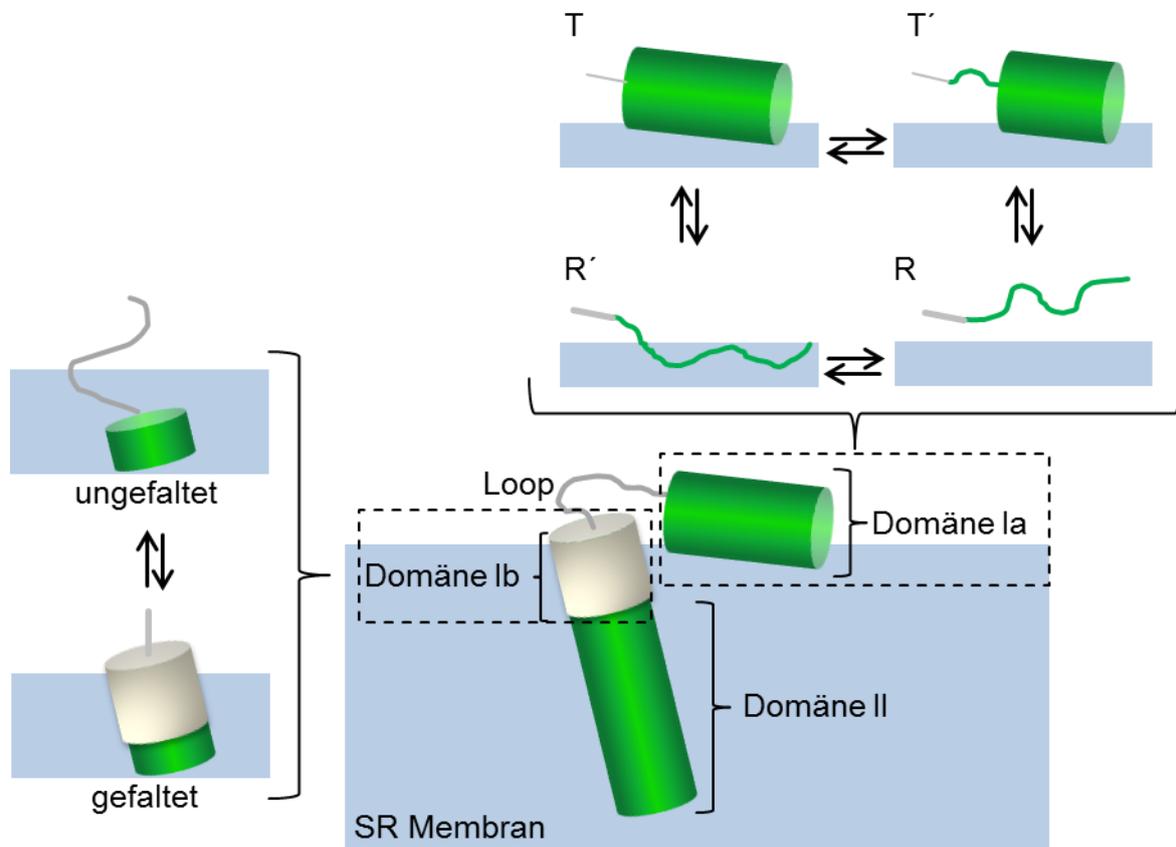


**Abb. 4: Aufbau des PLN-Monomers.**

PLN besteht aus zwei Hauptdomänen. Die zytosolische Domäne I, die die drei Phosphorylierungsstellen trägt, und die hydrophobe, transmembranäre Domäne II. Domäne I ist jeweils in zwei Subdomänen unterteilt, Domäne Ia und Domäne Ib. Domäne Ia sowie Domäne II bilden eine  $\alpha$ -Helix, Domäne Ib ist vergleichsweise unstrukturiert (Gustavsson *et al.*, 2011).

Die Domäne Ia kann mindestens vier verschiedenen Konformations-Zustände einnehmen (Karim *et al.*, 2006; Traaseth *et al.*, 2008; Gustavsson *et al.*, 2011). Der T-Zustand ist helikal und berührt die SR-Membran. Der T'-Zustand berührt ebenso die Membran, hat aber nur partiell eine helikale Konformation. Der R'-Zustand berührt zwar die SR-Membran, hat aber eine unstrukturierte Konformation. Im R-Zustand hat die Ia-Domäne eine unstrukturierte Konformation und ist außerdem noch von der SR-Membran abgelöst (Traaseth and Veglia, 2010). Masterson *et al.* zeigten außerdem, dass die katalytische Untereinheit der PKA bevorzugt an eine nicht an die SR Membran gebundene, unstrukturierte PLN-Konformation (R-Zustand) bindet und PLN in diesem Zustand phosphoryliert (Masterson *et al.*, 2011). Das dynamische Gleichgewicht aus diesen vier verschiedenen Konformationen stellt eine

wichtige Voraussetzung für die effiziente Phosphorylierung von PLN durch die PKA dar (Karim *et al.*, 2006).



**Abb. 5: Das Konformationsmodell von PLN.**

Die T-Konformation kann sich über die unstrukturierte, membrangebundene Konformation R' oder über die partiell unstrukturierte, membranassoziierte T'-Konformation in die R-Konformation umlagern. Dabei ist die Umlagerung der Domäne Ib, strukturiert oder unstrukturiert, unabhängig von der Konformation der Domäne Ia (Gustavsson *et al.*, 2011).

Für das PLN-Pentamer wurden über die letzten Jahre zwei völlig verschiedenen Modelle der Pentamer-Konformation postuliert (Verardi *et al.*, 2011), die Glockenblumen (*bellflower*) (Oxenoid and Chou, 2005) sowie die Windrad (*pinwheel*)-Struktur (Robia *et al.*, 2005). Die Konformation der Glockenblume besitzt eine trichterförmige transmembranäre Pore, bei der der zytosolische Bereich des PLN von der Membran abgelöst nach oben ragt. (Maffeo and Aksimentiev, 2009). Die Topologie der Windrad-Konformation zeigt eine verengte Anordnung

im transmembranären Bereich sowie eine an der Membran anliegende Konformation der zytosolischen Helices des PLN (Maffeo and Aksimentiev, 2009).

## 1.5 PLN-Phosphorylierung

Phospholamban besitzt drei verschiedene Phosphorylierungsstellen, Serin an Position 10 (Ser10), Serin an Position 16 (Ser16) und Threonin an Position 17 (Thr17) (Kranias and Hajjar, 2012). Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation wird Ser10 durch die Protein-Kinase C (PKC), Ser16 durch die Protein-Kinase A (PKA) und Thr17 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) phosphoryliert (Wegener *et al.*, 1989). Dadurch wird der inhibitorische Effekt des PLN auf die SERCA2a vermindert und gleichzeitig die Kalzium-Affinität der SERCA2a erhöht. Verschiedene *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass die Ser16-Phosphorylierung eine Voraussetzung zur Thr17-Phosphorylierung darstellt (Kuschel *et al.*, 1999). Außerdem wurde anhand von *in vitro*-Studien unter Verwendung von kardialen Membran-Vesikeln gezeigt, dass mit Hilfe von elektrischen Impulsen die Thr17-Phosphorylierung stimuliert werden kann ohne eine vorausgehende Ser16-Phosphorylierung zu benötigen (Mundiña-Weilenmann *et al.*, 1996). Mit diesen Versuchsergebnissen wurde gefolgert, dass die *in vivo* vorhandene Reihenfolge der Phosphorylierung aus der Interaktion zwischen dem PKA- und CaMKII- Signalweg herrührt (Hagemann and Xiao, 2002). Die Phosphorylierung von Ser10 scheint physiologisch keine Relevanz zu besitzen (Edes and Kranias, 1990; Kranias and Hajjar, 2012). Die Ser16- sowie Thr17-Phosphorylierung durch den PKA- bzw. CaMKII-Signalweg stellen die Hauptmediatoren des positiv inotropen und relaxierenden Effektes der  $\beta$ -adrenergen Stimulation im Herzmuskel dar (Mattiuzzi *et al.*, 2005). Der Anstieg der SERCA2a-Aktivität und die Erhöhung der Kalziumaufnahme, die durch diese Phosphorylierungswege entstehen, führen zu einem Geschwindigkeitsanstieg der Relaxation, der SR-Kalziumbelastung, und als Konsequenz daraus zu einer verstärkten SR-Kalziumfreisetzung und myokardialen Kontraktion. (Mundina de Weilenmann *et al.*, 1987; Wegener *et al.*, 1989; Vittone *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 2000).

## 1.6 Funktion von PLN-Monomer und -Pentamer

Phospholamban (PLN) befindet sich physiologisch in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Monomer und Pentamer (Kranias and Hajjar, 2012).

### 1.6.1 Die Aufgabe des PLN-Monomers

Verschiedenen Mutagenese-Studien, bei denen die Transmembranregion des PLN mutiert wurde, wiesen darauf hin, dass das PLN-Monomer im Gegensatz zum Pentamer einen stärkeren Inhibitor der Kalzium-ATPase SERCA2a darstellt (Kimura *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Asahi *et al.*, 1999; Cornea *et al.*, 2000). Das PLN-Monomer gilt somit als aktiv-inhibitorisch wirkende Form des PLN.

Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation und folgender PLN-Phosphorylierung verliert das Monomer seinen inhibitorischen Effekt auf die Kalzium-ATPase, dabei steigt die Aktivität der SERCA2a (MacLennan *et al.*, 1998). Daher wird angenommen, dass die inaktiven Monomere nach Phosphorylierung bevorzugt Pentamere bilden, diese sich aber auch wieder aus dem Pentamer lösen können, um für die Inhibition der Kalzium-ATPase zur Verfügung zu stehen (Kimura *et al.*, 1997).

Die Annahme der verstärkten Oligomerisierung nach Phosphorylierung des PLN-Monomers beruht auf verschiedenen Untersuchungen.

In isoelektrischen Fokussierungsversuchen von rekombinantem PLN, das in phosphorylierter Form radioaktiv markiert war ( $^{32}\text{P}$ -PLN), verschob sich der isoelektrische Punkt [pI] nach PKA-abhängiger Phosphorylierung von basisch (pI = 10) auf neutral (pI = 6,7) (Jones *et al.*, 1985). Diese drastische Verschiebung der pI interpretierten die Autoren als Zunahme der molekularen Größe des PLN-Proteins, woraus geschlossen wurde, dass PLN die Fähigkeit besitzt seine Konformation nach Phosphorylierung in Richtung Pentamer-Bildung zu verschieben (Simmernan and Jones, 1998).

Eine weitere Argumentation für die Verschiebung des Monomer-Pentamer-Gleichgewichtes in Richtung Pentamerbildung nach Phosphorylierung lieferten Cornea et al. (Cornea *et al.*, 1997). Rekombinantes PLN wurde bei diesen Versuchen in Phospholipiddoppelschichten eingebracht. Mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Versuchen wurden Kontakte mit Membranlipiden gemessen, die entweder mit PLN-Monomeren oder Pentameren in direktem Kontakt standen. Im basalen Zustand stand das Pentamer mit etwa zwölf Lipiden seiner Umgebung in direktem Kontakt, das Monomer hingegen mit sechs Lipiden, bzw. fünf Protomere mit dreißig Lipiden. Diese Interaktionsverteilung verschob sich nach Inkubation mit PKA. Mit der Phosphorylierung von PLN wurden die Interaktionen mit den angrenzenden Membranlipiden weniger. Mit diesem Ergebnis postulierten Cornea et al., dass nach Phosphorylierung die Monomere in die Pentamerformation übergehen, was durch die Abnahme der Nettoladung von +3 auf +1 aus älteren wissenschaftlichen Arbeiten bzw. durch die Abnahme der Kontaktstellen mit den angrenzenden Membranlipiden zu erklären sei (Chiesi and Schwaller, 1989). Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse wurde darauf geschlossen, dass eine verstärkte Oligomerisierung nach Phosphorylierung der Monomere stattfindet.

### **1.6.2 Die Aufgabe des PLN-Pentamers**

Wenn das Monomer die aktive Form des Pentamers darstellt, welche Aufgabe hat dann das Pentamer? Eine grundlegende Arbeit zu dieser Frage lieferte Kimura et al. durch Mutagenese-Studien, in denen alle Aminosäuren des PLN einzeln gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht wurden (Kimura *et al.*, 1997). Die Mutanten wurden zusammen mit SERCA2a in HEK293AD-Zellen exprimiert, auf Ihre Monomer-Pentamer-Verteilung mit SDS-PAGE und *Western blot*-Experiment untersucht und anschließend gemäß der gemessenen Geschwindigkeit der Kalzium-Aufnahme in Mikrosomen-Präparationen nach Funktionsklassen unterteilt. Die ausschließlich als Monomer vorliegenden Mutanten wirkten dabei überwiegend als eine Art „Superinhibitoren“ der SERCA2a. Dies bestätigte die

Funktion der Monomere als inhibierende Form der SERCA2a. Hingegen zeigten die Mutanten, die eine ähnliche Monomer-Pentamer-Verteilung wie das Wildtyp-PLN aufwiesen bzw. mehr Pentamer exprimierten, eine gleiche bzw. verminderte SERCA2a-Inhibition wie Wildtyp-PLN. Aus diesen Ergebnissen schlossen Kimura et al., dass das PLN-Oligomer inaktiv bzw. weniger aktiv ist als das Monomer. Das Monomer wurde dabei als eigentliche inhibitorisch wirkende Spezies und das Pentamer als eine Art Speicherform der Monomere definiert. Diese Annahme wird bis heute in der Literatur vertreten (MacLennan and Kranias, 2003; Kranias and Hajjar, 2012).

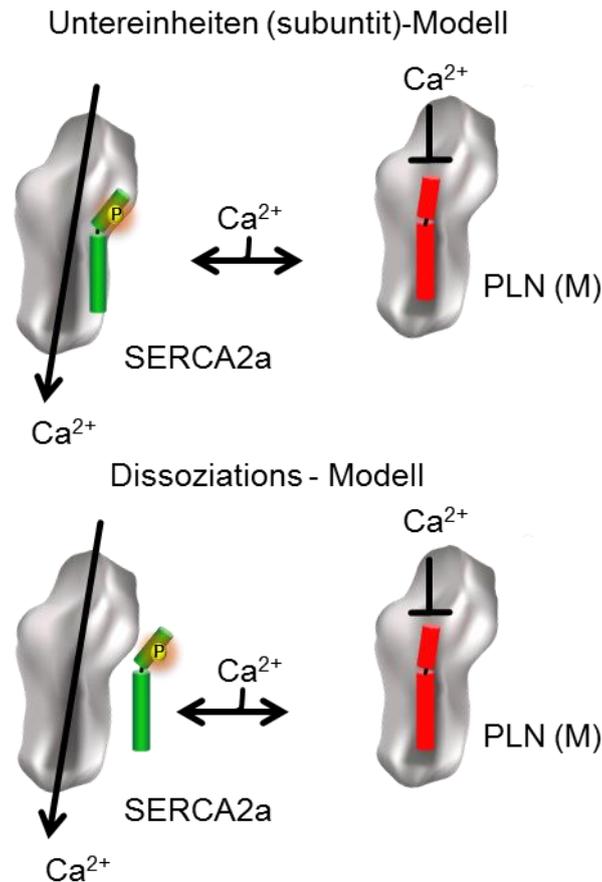
## 1.7 Dephosphorylierung von PLN mit PP1

Der Status der PLN-Phosphorylierung ist auch von der Aktivität der Protein-Phosphatase 1 (PP1) abhängig. Sie stellt die hauptsächliche SR-Phosphatase dar, die spezifisch PLN dephosphoryliert. PP1 ist eine Serin-/ Threonin-Phosphatase, die aus zwei Untereinheiten besteht, PP1<sub>G<sub>M</sub></sub> und PP1<sub>c</sub> (Mattiuzzi *et al.*, 2005). PP1<sub>G<sub>M</sub></sub> ist für die Lokalisation der katalytischen Untereinheit PP1<sub>c</sub> zum SR verantwortlich. Die Bindung von PP1<sub>c</sub> zu PP1<sub>G<sub>M</sub></sub> erhöht die Affinität von PP1<sub>c</sub> zu ihrem Substrat, PLN. Die PKA spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie phosphoryliert sowohl *in vivo* als auch *in vitro* PP1<sub>G<sub>M</sub></sub> an Serin48 (Ser48) und Serin67 (Ser67). Die Phosphorylierung an Ser67 triggert dabei die Dissoziation der Untereinheiten (PP1<sub>G<sub>M</sub></sub> und PP1<sub>c</sub>) voneinander und inaktiviert gleichzeitig die Phosphatase-Aktivität. Ser48 sowie Ser67 werden über die Serin-/ Threonin-Protein-Phosphatase 2A oder 2B (PP2A/ PP2B) dephosphoryliert, was die PP1 wieder aktiviert (Cohen, 1989). Des Weiteren wird PP1 auch durch zwei Hitze- und Säure-stabile Proteine reguliert, Inhibitor 1 (INH1) sowie Inhibitor 2 (INH2). Die PKA verstärkt somit ihr eigenes Signal (die Ser16-Phosphorylierung von PLN), indem sie PP1 und INH1 phosphoryliert und somit PP1 konsequent inhibiert (Cohen, 1989).

## 1.8 Interaktion zwischen SERCA2a und PLN

Bis heute existieren zwei verschiedenen Interaktionsmodelle von SERCA2a mit PLN, das Dissoziations- und das Untereinheiten (*subunit*)-Modell (Dong and Thomas, 2014). Im Dissoziations-Modell wird angenommen, dass PLN nach Phosphorylierung von der Kalzium-ATPase SERCA2a dissoziiert um die inhibitorische Wirkung aufzuheben. Diese Hypothese der Dissoziation basiert auf *crosslinking*- sowie Co-Immunpräzitationsversuche zwischen SERCA2a und PLN (James *et al.*, 1989; Asahi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). In diesen Versuchen wurden nach PLN-Phosphorylierung (Ser16) oder in Anwesenheit von hohen Kalzium-Konzentrationen verminderte physikalische Interaktion zwischen SERCA2a und PLN gefunden (**Abb. 6**).

Neuere spektroskopische Studien unterstützen das Untereinheiten- (*subunit*)-Modell. In diesem Modell wird die Inhibition der SERCA2a nicht durch Dissoziation von PLN nach Phosphorylierung sondern durch strukturelle Umlagerungen im SERCA2a-PLN-Komplex aufgehoben (Dong and Thomas, 2014). Untersuchungen mittels Elektron-paramagnetischer-Resonanz (EPR) sowie Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zeigten, dass PLN nach Phosphorylierung an der SERCA2a gebunden bleibt, auch wenn die Kalzium-ATPase aktiv war (**Abb. 6**) (Mueller *et al.*, 2004; Bidwell *et al.*, 2011; Gruber *et al.*, 2012; James *et al.*, 2012).



**Abb. 6: Dissoziations- und Untereinheiten-Modell der PLN-SERCA2a-Interaktion**

Im Untereinheiten-(*subunit*)-Modell wird die Inhibition nur durch Konformationsänderung und Umlagerung aufgehoben. PLN-Monomer dissoziiert dabei nicht von der Kalziumpumpe SERCA2a. Im Dissoziations-Modell hingegen wird die SERCA2a durch Assoziation und Diffusion des PLN-Monomers reguliert.

In der erst kürzlich veröffentlichten Studie bestätigten Dong et al. unter Verwendung zeitgelöster FRET-Experimente (TR-FRET), dass nach Ser16-Phosphorylierung von PLN die SERCA2a-Inhibition vollständig aufgehoben wird (Dong and Thomas, 2014). Dabei kommt es zu einer partiellen, sehr geringen Dissoziation von PLN vom Komplex. Da allerdings die SERCA2a-Expression im Herzen mindestens 10-fach höher ist als in den TR-FRET-Experimenten, folgerten Dong et al., dass das meiste PLN nach Phosphorylierung an der SERCA2a gebunden bleibt. Nur durch Konformationsänderung des T/ R-Equilibriums des PLN in Richtung R-Konformation scheint die SERCA2a-Inhibition aufgehoben zu werden.

Die intermolekularen Interaktionsstellen zwischen SERCA2a und PLN wurden in Mutagenese- und *crosslinking*-Experimenten ermittelt. Toyoshima et al. arbeiteten mit Cystein-Mutanten des PLN (Asn30Cys/ Asn27Cys) und SERCA2a (Leu321Cys) (Toyoshima et al., 2003). Mit Hilfe von Mikrosomen-Präparationen und folgenden *crosslinking*-Experimenten unter Verwendung von Glutathion (reduzierend wirkendes Reagenz) konnte mittels *SDS-PAGE* und *Western blot*-Analysen gezeigt werden, dass PLN mit den Helices M2, M4, M6 und M9 des transmembranären Bereiches der SERCA2a interagiert. Dabei passt PLN in eine Art transmembranäre Rinne, die durch M2, M4, M6 und M9 gebildet wird. PLN reicht durch die SR-Membran in den zytosolischen Bereich der SERCA2a-N-Domäne und interagiert zusätzlich im zytosolischen Bereich zwischen Lysin3 (Lys3) und Isoleucin18 (Ile18) mit Lysin397(Lys397) und Valin402 (Val402) der SERCA2a (Toyofuku et al., 1994; Kimura et al., 1996; Kimura et al., 1998).

In weiteren Experimenten wurde die Möglichkeit der PLN-Pentamer-SERCA2a-Interaktion entdeckt. Chu et al. lieferten für diese Hypothese den ersten Baustein (Chu et al., 1998). Sie generierten transgene Mäuse, die entweder Wildtyp-PLN oder eine PLN-Mutante, die ausschließlich PLN-Monomere bildete (PLN-C41F), kardial überexprimierten. Die Tiere wurden mit PLN-KO-Mäusen gekreuzt, so dass das endogene PLN ausgeschaltet war. Anschließend charakterisierten sie die gleich stark exprimierenden transgenen Mauslinien. Dabei zeigten die Wildtyp-Mäuse einen stärkeren Abfall der kardialen Funktion als die PLN-Mutanten, die nur als Monomer vorlagen. Letztere zeigte dabei eine verminderte Kalzium-Abnahme und Relaxation im Vergleich zu Wildtyp-PLN-Mäusen. Aus diesen Befunden folgerten sie, dass die Pentamere eine wichtige Rolle für die optimale Regulation der Kontraktilität *in vivo* darstellten.

Oxenoid et al. zeigten ein erstes Modell der möglichen Interaktion zwischen SERCA2a und PLN-Pentamer (Oxenoid and Chou, 2005). Über NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass

die Bausteine, die für die SERCA2a-Interaktion wichtig sind, sowohl auf dem membranseitigen Teil innerhalb der Transmembranregion des Pentamers lokalisiert sind (mit Ausnahme von N34 sowie I48) als auch außerhalb der Transmembran lokalisiert sind. Diese Bausteine beeinflussen dabei die Oligomerisierung des PLN nicht. Bei diesem Modell passt das Pentamer in eine Furche, die seitlich an der SERCA2a lokalisiert zu sein scheint. Diese Befunde deuten darauf hin, dass PLN an die Kalzium-ATPase binden kann ohne zuvor in seine Untereinheiten dissoziieren zu müssen. Diese Möglichkeit der Regulation stimmt mit dem Befund von NMR-Studien *in vitro* überein, die gezeigt haben, dass die Zugabe von SERCA2a zu Wildtyp-PLN den Anteil an PLN-Monomeren erhöht (Reddy *et al.*, 1999).

In elektronenmikroskopischen Versuchen von großen zweidimensionalen Co-Kristallen, die SERCA2a sowie PLN-Monomere (PLN-I40A) beinhalten, fanden Stokes *et al.* in einem dreidimensionalen Modell heraus, dass trotz Verwendung von PLN-Monomeren die Lagerungsdichte mit der Dichte der Pentamer-Anordnung übereinstimmten (Stokes *et al.*, 2006). Somit stellten sie die Hypothese auf, dass PLN-Pentamere die Fähigkeit besitzen mit SERCA2a zu interagieren und es eventuell möglich wäre, dass Pentamere parallel mit zwei Kalziumpumpen gleichzeitig in Wechselwirkung treten könnten. Die Interaktion des Pentamers mit der SERCA2a wurde von Glaves *et al.* anhand von Co-Kristallen und einer bevorzugt Pentamere bildenden Mutante (Lys27Ala) näher untersucht (Glaves *et al.*, 2011). Es zeigte sich, dass Pentamere an einer zusätzlichen Stelle im Bereich von Helix M3 der SERCA2a zu binden scheinen, deutlich entfernt von der inhibitorischen Bindestelle des Monomers. Während die Bindungsstellen des Monomers bewegungsfähig sind, ist die Helix M3 wenig flexibel und stellt damit einen stabilen Interaktionspunkt für das Pentamer dar.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

PLN reguliert im Herzen die Aktivität der Kalzium-ATPase SERCA2a. Obwohl PLN in den Myozyten zu etwa 80 % als Pentamer vorliegt, ist bis heute unklar, ob dieser Oligomerisierung eine physiologische Bedeutung zukommt.

Für diese Arbeit sollte die Funktion der PLN-Pentamere näher untersucht werden. Es wurde die Hypothese verfolgt, dass die PLN-Pentamere bei der PKA-abhängigen Phosphorylierung des PLN und damit bei der Regulation der PLN-Aktivität von Bedeutung sind. Die Aufgabenstellung sah vor, die Phosphorylierungsmuster von Monomeren und Pentameren getrennt in transfizierten Zellen sowie in transgenen Mäusen anhand von PLN-Mutanten mit unterschiedlicher Oligomerisierungsaffinität zu untersuchen. Des Weiteren sollte mit Hilfe von Immunpräzipitationsuntersuchungen die Interaktion der Pentamere mit SERCA2a untersucht werden und enzymatische Messungen sollten den Einfluss von Pentameren auf die SERCA2a-Aktivität analysieren. Für alle Versuche war ein Vergleich der Ergebnisse mit und ohne PLN-Pentamere sowie mit und ohne PKA-Stimulation geplant. Von diesem Ansatz wurde erwartet, neue Einblicke in die Funktion der PLN-Pentamere im Speziellen und allgemein in die Regulation des myozytären Kalziumhaushalts zu gewinnen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Bezeichnung	Synonym	Bestellnummer	Hersteller
Adenosintriphosphat	ATP	7699	Sigma
Agar		A0949	AppliChem
Agarose (peggold)		35-1020	Peqlab
Ammoniumperoxodisulfat	APS	1201	Millipore
Ampicillin-Na	Ampi	A9518	AppliChem
Benzamidin		B6506	Sigma
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan-Sulfonsäure	BES	B4554	Sigma
Bismaleimidohexan	BMH	22330	ThermoFischer
Bromphenolblau		B6131	AppliChem
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1.02382	Millipore
Dimethylsulfoxid	DMSO	A1584	AppliChem
Disuccinimidylglutarat	DSG	80424	AppliChem
Dithiothreitol	DTT	11474	AppliChem
Eisessig > 99 %		6283	Sigma
Ethanol 100 %	EtOH (100 %)	32205	Sigma
Ethidiumbromid		A1152	AppliChem
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	E9884	Sigma
Ethylenglycol-bis-[succinimidylsuccinate]	EGS	E3257	Sigma
Ethylenglycol-bis(aminoethylether) N,N,N,N-tetraessigsäure	EGTA	E3889	AppliChem
Forskolin	Forsk	F6886	Sigma

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Glycerol (85 %)		4094	Millipore
Glycin		A1067	AppliChem
Hefe-Extrakt		A1552	AppliChem
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	A1069	AppliChem
Kaliumchlorid	KCl	A3582	AppliChem
Magermilchpulver		A0830	AppliChem
Magnesiumchlorid-hexahydrat	$MgCl_2 \times 6H_2O$	A3618	AppliChem
Mangan-(II)chlorid-tetrahydrat	$MnCl_2 \times 4H_2O$	A2087	AppliChem
Methanol	MeOH	32213	Sigma
Natriumacid	$NaN_3$	6688	Merck
Natriumchlorid	NaCl	A1371	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat	$NaH_2PO_4$	6346	Merck
Natriumfluorid	NaF	S6521	Sigma
Natriumhydroxid-Perlen	NaOH	A4224	AppliChem
Natriumorthovanadat	$Na_3VO_4$	S6508	Sigma
Natriumpyrophosphat	$Na_4P_2O_7$	S9515	Sigma
Nicotinamidadenindinukleotid	NADH	N8129	Sigma
Nonidet 40	NP 40	N3516	AppliChem
Pepton		A2210	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	P7626	Sigma
Phosphoenolpyruvat	PEP	P0564	Sigma
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	PIPES	A3495	AppliChem
Polysorbat 20	Tween 20	A4974	AppliChem
D-(+)Saccharose	Succrose	S0389	Sigma
Salzsäure (rauchend 37 %)	HCl konz.	A2211	AppliChem

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Sodiumdodecylsulfat	SDS	A1502	AppliChem
Soybeantrypsin		A1441	AppliChem
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin	TEMED	A1148	AppliChem
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	A2264	AppliChem

### 2.1.1 Zellkultur

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	P04-03600	PAN Biotech
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	DPBS	D8537	Sigma
Fötales Kälberserum; <i>Fetale Calf Serum</i>	FCS	S0115	Biochrom AG
L-Glutamin	L-Glut	P04-80100	PAN Biotech
Penicillin/Streptomycin	Pen/ Strep	P06-07100	PAN Biotech
Poly-D-Lysin		150175	MP Biomed
Steriles, pyrogenfreies Wasser	steril.H <sub>2</sub> O	H2OMBO124	Millipore
Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 %	Tryp/EDTA	P10-023100	PAN Biotech

### 2.1.2 Fertiglösungen/ Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
aABis-Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1)	aABis	3029.1	Roth
<i>BCA Protein Assay Kit®</i>	BCA Kit	23225	ThermoScientific
<i>Dynabeads® Protein G</i>	<i>beads G</i>	10003D	Lifetech
<i>Dynabeads® Protein A</i>	<i>beads A</i>	10001D	Lifetech

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Kodak GBX Developer and Replenisher	Entwickler	P7042-5GA	Sigma
Kodak GBX Fixer and Replenisher	Fixierer	P7167-5GA	Sigma
Luminata Forte Western HRP Substrat	Luminata	WBLUF0500	Millipore
Nucleobound Xtra Midi		740410.50	Macherey Nagel
Phosphate binding Tag	<i>PhosTag<sup>TM</sup></i>	AAL-107	Wako Chemicals
Pyruvatkinase/ Laktatdehydrogenase- Enzymmix	Enzymmix	P0294	Sigma
QIAquick® Gel Extraction Kit		28706	Quiagen

### 2.1.3 Antikörper

#### 2.1.3.1 Primäre Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer/Hersteller</b>
Anti-FLAG M2	1 : 5000/ 1 : 50 (IP)	anti-FLAG	F3165 Sigma
Anti-myc	1 : 1000	anti-myc	06-549 Millipore
Anti-phospho- PLN(Ser16) AP (Affinity Purified)	1 : 5000	anti-phospho- PLN(Ser16)	A010-12AP Badrilla (UK)
Anti-PLN A1	1 : 5000	anti-PLN A1	A010-14 Badrilla (UK)
Anti-SERCA2a	1 : 5000	anti-SERCA2a	A010-21AP Badrilla (UK)
ATP2A2/SERCA2- (D51B11)	1 : 50 (IP)		9580S NEB
Beta-Aktin	1 : 5000	β-Aktin	A5441 Sigma

Alle Primärantikörper wurden in Blockmilch verdünnt und bei -20 °C gelagert. Nur anti-phospho-PLN(Ser16)AP wurde in BSA-freiem Waschpuffer mit 0,05 % Natriumazid verdünnt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.1.3.2. Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Synonym	Bestellnummer	Hersteller
anti-Maus IgG HRPO (Ziege)	1 : 10000 mouse O	115035003	Dianova
anti-Kaninchen IgG HRPO (Ziege)	1 : 10000 rabbit X	111035144	Dianova

### 2.1.4 Höhenmarker

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Protein Marker III 20 - 122 kDa	27-1111	Peqlab
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 10 - 260 kDa	SM1841	ThermoScientific
1 kb DNA Ladder	N3232L	NEB

### 2.1.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz
PLN36AF	5'-TAT CAA TTT CGC TCT CAT CTT GAT ATG TCT CC-3'
PLN36AR	5'-CAA GAT GAG AGC GAA ATT GAT AAA TAG GTT CT-3'
PLN41FF	5'-CAT CTT GAT ATT TCT CCT GCT GAT CTG CAT CA-3'
PLN41FR	5'-CAG CAG GAG AAA TAT CAA GAT GAG ACA GAA AT-3'
PLN46FF	5'-CCT GCT GAT CTT CAT CAT CGT CAT GCT TCT CT-3'
PLN46FR	5'-GAC GAT GAT GAA GAT CAG CAG GAG ACA TAT CA-3'
PLN46AF	5'-CCT GCT GAT CGC CAT CAT CGT CAT GCT TCT CT-3'
PLN46AR	5'-GAC GAT GAT GGC GAT CAG CAG GAG ACA TAT CA-3'
PLN37AF	5'-CAA TTT CTG TGC CAT CTT GAT ATG TCT CCT GC-3'
PLN37AR	5'-TAT CAA GAT GGC ACA GAA ATT GAT AAA TAG GT-3'
PLN40AF	5'-TCT CAT CTT GGC ATG TCT CCT GCT GAT CTG CA-3'
PLN40AR	5'-CAG GAG ACA TGC CAA GAT GAG ACA GAA ATT GA-3'
PLN37A40AF	5'-CAA TTT CTG TGC CAT CTT GGC ATG TCT CCT GC-3'
PLN37A40AR	5'-TGC CAA GAT GGC ACA GAA ATT GAT AAA TAG GT
PLNI45AF	5'-TCT CCT GCT GGC CTG CAT CAT CGT CAT GCT TC-3'
PLNI45AR	5'-GAT GAT GCA GGC CAG CAG GAG ACA TAT CAA GA-3'
PLNV49AF	5'-TGC ATC ATC GCC ATG CTT CTC TGA CTG AAT TC-3'
PLNV49AR	5'-GAG AAG CAT GGC GAT GAT GCA GAT CAG CAG G-3'
PLN36FF	5'-TAT CAA TTT CTT TCT CAT CTT GAT ATG TCT CC-3'
PLN36FR	5'-CAA GAT GAG AAA GAA ATT GAT AAA TAG GTT CT-3'
PLNV49AR1R	5'-CTG TCA AGG AAT TCA GTC AGA GAA GCA TGG CGA TG-3'
PLN16AF	5'-AAG AAG GGC CGC AAC CAT TGA AAT GCC TCA A-3'
PLN16AR	5'-TCA ATG GTT GCG GCC CTT CTT ATA GCA GAG C-3'
PLN16EF	5'-AAG AAG GGC CGA AAC CAT TGA AAT GCC TCA AC-3'
PLN16ER	5'-TTC AAT GGT TTC GGC CCT TCT TAT AGC AGA GC-3'

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
PLN16A17AF	5'-AAG AAG GGC CGC AGG CAT TGA AAT GCC TCA ACA A-3'
PLN16A17AR	5'-ATT TCA ATG GCT GCG GCC CTT CTT ATA GCA GAG GAG C-3'
PLNC41AF	5'-CAT CTT GAT AGC TCT CCT GCT GAT CTG CAT CA-3'
PLNC41AR	5'-CAG CAG GAG AGC TAT CAA GAT GAG ACA GAA AT-3'
FLAGtmPLNR	5'-ACA GAA ATT GAT AAA TAG TTT ATC GTC GTC GTC TTT-3'
FLAG-tmPLNF	5'-AAA GAC GAC GAC GAT AAA CTA TTT ATC AAT TTC TGT-3'
PLNC36FF	5'-TAT CAA TTT CTT TCT CAT CTT GAT ATG TCT CC-3'
PLN36FR	5'-CAA GAT GAG AAA GAA ATT GAT AAA TAG GTT CT-3'
PLNC46FF	5'-CCT GCT GAT CTT CAT CAT CGT CAT GCT TCT CT-3'
PLN46FR	5'-GAC GAT GAT GAA GAT CAG CAG GAG ACA TAT CA-3'
PLNAAA-PLNF	5'-CAT CTT GAT ATT TCT CCT GCT GAT CTT CAT CA-3'
PLNAAA-PLNR	5'-CAG CAG GAG AAA TAT CAA GAT GAG AAA GAA AT-3'
PLNFLAG28F	5'-TCA AAA CCT CGA TTA TAA AGA CGA CGA CGA TAA ACA GAA CCT ATT TAT CAA TTT-3'
PLNFLAG28R	5'-ATA GGT TCT GTT TAT CGT CGT CGT CTT TAT AAT CGA GGT TTT GAC GTG CTT GTT-3'
PLNFLAG29F	5'-AAA CCT CCA GGA TTA TAA AGA CGA CGA CGA TAA AAA CCT ATT TAT CAA TTT CTG-3'
PLNFLAG29R	5'-TAA ATA GGT TTT TAT CGT CGT CGT CTT TAT AAT CCT GGA GGT TTT GAC GTG CTT-3'
PLNFLAG30F	5'-CCT CCA GAA CGA TTA TAA AGA CGA CGA CGA TAA ACT ATT TAT CAA -3'
PLNFLAG30R	5'-TGA TAA ATA GTT TAT CGT CGT CGT CTT TAT AAT CGT TCT GGA GGT-3'
PLN30CF	5'-AAA CCT CCA GTG CCT ATT TAT CAA TTT CTG TC-3'
PLN30CR	5'-GAT AAA TAG GCA CTG GAG GTT TTG ACG TGC TT-3'
PLNRIR	5'-CTG TCA AGG AAT TCA GTC AGA GAA GCA TGA CGA TG-3'
PLN-BamF	5'-CTG TTA GGA TCC ATG GAT TAT AAA GAC GAC GAC-3'
SERCAF(1)	5'-GCC GCG GAG GAG GAG GAG GAG AA-3'

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
SERCAF(2)	5'-GAG TGC GAG GCG GTA GGC GAG GAG-3'
SERCA2RIR	5'-CTG TCA AGG AAT TCA GTT ACT CCA GTA TTG CGG GTT-3'
FLAGHindHindF	5'-TTG ACA TCA AGC TTA TGG ATT ATA AAG ACG ACG ACG ATA AAT GAA-3'
FLAGHindHindR	5'- ATA AGT ACA AGC TTT CAT TTA TCG TCG TCG TCT TTA TAA TCC ATA-3'
MycHindHindF	5'-TTG ACA TCA AGC TTA TGG AGC AGA AGC TGA TCT CAG AGG AGG ACC-3'
MycHindHindR	5'-ATA AGT ACA AGC TTT CAC AGG TCC TCC TCT GAG ATC AGC TTC TGC-3'

### 2.1.6 Enzyme für Klonierung

<b>Polymerase</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Vent® DNA Polymerase	M0254L	NEB
ThermoPol® Puffer	im Vent Kit enthalten M0254L	NEB

<b>Restriktionsenzyme</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Bam HI	R0136S	NEB
Eco RI	R0101S	NEB
NEB Puffer 3 (10x)	B7003S	NEB

<b>Ligase</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
T4-Ligase	M0202S	NEB

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Synonym	Bestellnummer	Hersteller
Eppendorf Tubes 2.0ml		0030120094	Eppendorf
Reaktionsgefäß Tubes 15ml		352096	BD
Reaktionsgefäß Tubes 50ml		352070	BD
PCR 96-well TW-MT- Platte Farblos; DNase, RNase frei		712400	Biozym
Fujifilm Super RX, UV	Film	RF12	Hartenstein
Gel Loader Tips		GS20	Hartenstein
Gel-Blotting-Filterpapier 0,35 mm; 195 g/ m <sup>2</sup>		GB58	Hartenstein
Handschuhe Peha-soft (Latex)		942161	Hartmann
Handschuhe SensiCarelce (Nitril)		486801P	Medline
Kulturröhrchen		KU59	Hartenstein
PCR 8-Flat Cap thin wall strips		328379	Biozym
Microwell TM Zellkulturschalen, F-Form NUNC		MW02	Hartenstein
Immobilon-P PVDF Membran 0,45 µm		IPVH00010	Millipore
Rundboden-Tubes 2,0 ml		04-232	Nerbe Plus
Safe Lock Tubes 0,5 ml		0030121023	Eppendorf
Safe Lock Tubes 1,5 ml		0030120086	Eppendorf
SNAP i.d. 2.0 Midi Blot Holders		SNAP2BHMD0100	Millipore
Spitzen (0,1 – 10 µl) weiß		0030000811	Eppendorf
Spitzen (2 – 200 µl) gelb		0030000870	Eppendorf

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Synonym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Spitzen (50 - 1000 µl) blau		0030000919	Eppendorf
Spitzen gestopft (0,1 - 10 µl)		07-613-7300	Nerbe Plus
Spitzen gestopft (0 - 20 µl)		07-622-7300	Nerbe Plus
Spitzen gestopft (0 - 200 µl)		07-662-7300	Nerbe Plus
Spitzen gestopft (100 - 1000 µl)		07-692-7300	Nerbe Plus
Spritzenvorsatzfilter, high flow rate		FMS2/FMS4	Hartenstein
Zellkulturschalen 150 x 20 mm NUNC		GK04	Hartenstein
Zellkulturschalen 5 x 10 mm NUNC		GK01	Hartenstein
Zellkulturschalen 60 x 5 mm NUNC		GK02	Hartenstein
Zellschaber 24 cm x 13 mm (steril)		CS24	Hartenstein

### 2.1.8 Geräte

<b>Name des Gerätes</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting Station	Critterion® 170-4071	BioRad
Brutschrank (ZK)	Heraeus BB6220	ThermoScientific
Electrophoresis Power Supply	EPS301	Amersham
EnVision™ multilabel reader	2104-0010; Photometer	PerkinElmer
Feinwaage	AT261 DeltaRange®	Mettler
Gefrierschrank (-20 °C)	comfort	LIEBHERR
Gefrierschrank (-80 °C)	HERAfreezHFU2585SIBAS-V36	Kendro
Midi Elektrophorese Einheit	SE 640	Hofer
Optima™TLX Ultrazentrifuge	CTX94A02	BECKMANN
Overhead-shaker	REAX 2	Heidolph
PCR Cycler	Mastercycler ep gradient	Eppendorf
Pipetboy	accu-jet® pro	BRAND
Pipetten	Eppendorf Reserach	Eppendorf
Protein Detektionssystem	SNAP i.d® 2.0	Millipore
Rotlicht (Dunkelkammer)	LED „Safelight X“ (λ640nm)	Medtech Hohl
Rührplatte	RCT basic	IKA® WERKE
SONO PULS Sonifikator	HD 200	BANDELIN
Thermomixer	Eppendorf comfort 2ml	Eppendorf
Tischzentrifuge 2	Centrifuge5417R	Eppendorf
Tischzentrifuge	5415D Centrifuge	Eppendorf
TOLEDO Five easy pH Elektrode	FE 20	METTLER
Vakuumpumpe	Millivac Maxi SD1P014M04	Millipore
Vortex	VORTEX GENIE 2	Scientific Ind.
Waage	PM4800 DeltaRange®	Mettler
Waage	TOLEDO® PG4002-S	Mettler

Name des Gerätes	Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad	Typ 1002	GFL®
Wasserbad (ZK)	Typ1004	GFL®
Zentrifuge	ROTINA 48R	HETTICH
Zentrifuge	Avanti J-25	BECKMAN
Schwenktisch (Kühlraum)	WT 12	Biometra®

### 2.1.9 Software

Bezeichnung	Hersteller
Graph Pad Prism Version 6	GraphPad software
Image J software	Wayne Rasband (NIH)
Windows 7 Excel/ Word/ Power Point	Microsoft Corporation

## 2.2 Lösungen und Puffer

### 2.2.1 für Klonierung

#### LB („Lysogeny Broth“)

#### Nährmedium für E. coli (Escherichia coli):

5 g NaCl

5 g Hefe-Extrakt

10 g Pepton

1 mM NaOH

ad 1 L Milipore Wasser

Lösung wurde in 500 ml Flaschen aufgeteilt und anschließend autoklaviert. Das sterile Medium hält sich einige Wochen im Kühlraum.

Lösung für 1,5 % Agar Zellkulturschalen: 7,5 g Agar auf 500 ml LB-Nährmedium

Lösung wurde autoklaviert. Nach Abkühlung auf 60 °C wurden 500 µl Ampicillin (1000x) zugegeben und die Zellkulturschalen unter dem Abzug gegossen, bis zur vollständigen Polymerisierung stehen gelassen, anschließend verpackt sowie im Kühlraum aufbewahrt.

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50x):

2 M Tris  
1 M Eisessig  
50 mM EDTA  
ad 1 L Millipore Wasser

Ampicillin-Stocklösung (1000x):

100 mg Ampicillin-Na in 1 ml Millipore Wasser lösen und über Filter mit 20 µm Porengröße sterilfiltrieren, in Reaktionsgefäße aufteilen und bei -20 °C lagern.

TSB (Transformation and Storage Buffer):

10 % (M/V) PEG 300  
5 % (V/V) DMSO  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
in LB-Medium, pH 6,1; steril filtrieren

5x KCM-Puffer (Kalium-Kalzium-Magnesium-Puffer):

500 mM KCl  
150 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM MgCl<sub>2</sub>

## 2.2.2 für Transfektion, Kultivierung und Kryokonservierung

### Transfektion:

2x BBS (BES buffered saline): 50 mM BES  
280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 6,95 bei 20 °C Raumtemperatur genau einstellen steril  
filtrieren

2,5 M CaCl<sub>2</sub> Lösung: 2,5 M CaCl<sub>2</sub> in Millipore Wasser steril filtrieren

### Kultivierung:

Kulturmedium: DMEM (w/o L-Glut; w/o Pen/ Strep; w/o FCS; w 4,5 g/ L  
Glukose)  
1 % Pen/Strep (= 10000 U/ ml Penicillin; 10 mg/ ml  
Streptomycin)  
10 % FCS  
2 mM L-Glutamin

DPBS: Sterile Fertiglösung von Sigma (#8537)

Trypsin/ EDTA-Lösung: 0,05 % Trypsin sowie 0,02 % EDTA in DPBS

### Kryokonservierung:

Einfriermedium: 70 % Medium  
20 % DMSO  
10 % FCS

**2.2.3 für die Zellyse**

1x Lämmli-Lysepuffer: 1:5 5x Lämmli  
1:100 Proteaseinhibitor  
1:1000 PMSF  
1:10 Phosphataseinhibitoren in sterilem DPBS

DPBS-Erntelösung: 1:100 Proteaseinhibitor  
1:1000 PMSF  
1:10 Phosphataseinhibitor  
in steriler DPBS-Lösung

**2.2.4 für Western Blot**

Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris pH 6,8  
2,0 g SDS  
ad 500 ml Millipore Wasser

Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris pH 8,8  
0,2 % (m/v) SDS  
ad 500 ml Millipore Wasser

Laufpuffer (10x): 0,25 M Tris  
1,92 M Glycin  
1 % (m/v) SDS  
ad 1 L Millipore Wasser

---

<u>Sammelgel-Mix:</u>	8,25 ml Wasser 3,30 ml Sammelgel Puffer 1,65 ml Aa/ Bis 13,20 µl TEMED 132,00 µl APS
<u>Trenngel-Mix:</u>	8,50 ml H <sub>2</sub> O 7,87 ml Trenngel Puffer 15,75 ml Aa/ Bis 15,75 µl TEMED 204,75 µl APS
<u>PhosTag<sup>TM</sup>-Gel:</u>	25 µM MnCl <sub>2</sub> 25 µM PhosTag <sup>TM</sup> zusätzlich zum Trenngel Mix
<u>APS (Ammoniumperoxodisulfat):</u>	10 % (m/v) in Millipore Wasser
<u>5x Lämmli-Puffer:</u>	0,25 M Tris pH 6,8 5 % SDS 80 % Glycerol
<u>Proteaseinhibitor (100x):</u>	2 mg/ ml <i>Soybean</i> trypsin 6 mg/ ml Benzamidin in 50 mM Tris bei -20 °C aufbewahren

<u>Phosphataseinhibitor (10x):</u>	500 mM NaF 50 mM Na <sub>4</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,02 % NaN <sub>3</sub> bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahren
<u>PMSF (1000x):</u>	100 mM PMSF in Ethanol 100 %
<u>Transblot-Puffer (1x):</u>	25 mM Tris 150 mM Glycin pH 8,3 stellt sich ein, dann 10 % Methanol zugeben
<u>Blockmilch:</u>	5 % Milchpulver 0,03 M NaCl 10 mM Tris pH 7.6 0,01 % Tween 20
<u>Blockmilch (SNAP i.d.):</u>	0,1 % Magermilchpulver 0,03 M NaCl 10 mM Tris pH 7,6 0,01 % Tween 20
<u>Waschpuffer:</u>	150 mM NaCl 50 mM Tris pH 7,4 0,2 % NP 40 0,2 % BSA (nicht für SNAP i.d)

### 2.2.5 für Rohmembranpräparation

Präparationspuffer: 300 mM Succrose  
20 mM Pipes  
1 mM PMSF  
10 mM EDTA  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Millipore Wasser pH 7,4

Aufbewahrungspuffer: 400 mM Succrose  
5 mM HEPES  
5 mM Tris  
10 mM EDTA  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Millipore Wasser pH 7,2

### 2.2.6 für NADH-abhängige, enzymgekoppelte SERCA2a-Aktivitätsmessung

HEPES-Puffer-Mix 7 mM HEPES  
143 mM KCl  
7 mM MgCl<sub>2</sub>  
143 mM CaCl<sub>2</sub>  
85,6 µM EGTA  
0,43 mM Sucrose  
in Millipore Wasser pH 7,0

ATP (Adenosintriphosphat)-  
Stocklösung: 50 mM ATP in Millipore Wasser pH 7,0;  
Bei -20 °C gelagert

PEP (Phosphoenolpyruvat)-  
Stocklösung: 100 mM PEP in Millipore Wasser;

NADH (Nicotinamidadenin-  
dinucleotid)-Stocklösung: 10 mM NADH in Millipore Wasser;

---

<u>Reaktionsmix:</u>	196,5 ul HEPES-Puffer-Mix
	25 ul (1 mM) NADH-Stocklösung
	2,5 ul (1 mM) Phosphoenolpyruvat (PEP)-Stocklösung
	15 ul Enzym-Mix (= 9 - 15 U PK/ 13,5 – 21 U LDH)
	5 µl (1 mM) ATP-Stocklösung pH 7,0

### 2.2.7 für Co-Immunpräzipitation

<u>NP-40-Lysepuffer:</u>	25 mM Tris pH8,0
	150 mM NaCl
	25 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	50 mM β-Glycerophosphat
	2 mM EDTA
	2 mM EGTA
	10 % Glycerol
	0,05 % NP-40
	ad 1 L Millipore Wasser
	25 mM HEPES

<u>Triton-X100 Lysepuffer:</u>	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 % Glycerol
	1 % Triton-X-100

<u>DPBS-Lysepuffer:</u>	1 : 100 Proteaseinhibitor
	1 : 10 Phosphataseinhibitor
	1 : 1000 PMSF
	ad DPBS steril

<u>Waschpuffer für Dynabeads®:</u>	0,02 % Tween 20 in steriler DPBS-Lösung
------------------------------------	---

Denaturierende Elutionslösung: 1x Lämmli-Puffer (siehe 2.2.3 Lösungen für *Western blots*)

Nicht-denaturierender  
Elutionspuffer: 50 mM Glycin pH 2,8

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Klonierung von Phospholamban-Mutanten

#### 2.3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) – Standardprotokoll der Phospholamban-Klonierung

Die von K.B. Mullis 1987 erstmals etablierte Möglichkeit zur enzymatischen Vervielfältigung von Nucleotidsequenzen wurde weiterentwickelt, um Punktmutationen, Deletionen und Affinitätssequenzen mittels Oligonukleotid- (Primer) gerichteter Mutagenese, einzuführen.

##### PCR Mix für Gesamtansatz 20 µl (n=1):

Primer 1 (10 µM)	1,0µl
Primer 2 (10 µM)	1,0 µl
Thermopolpuffer	2,0 µl
dNTPs (2 mM)	2,0 µl
H <sub>2</sub> O	12,8 µl
Vent-Polymerase	0,2µl

PCR Ansatz: 19 µl Mix + 1,0 µl Template (1 ng/ µl)

##### **PCR-Cycler-Bedingungen**

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	25 s	} 30 Zyklen
Primer- <i>annealing</i>	55 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
Finale Extension	72 °C	7 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphat), Primer sowie Template wurden aufgetaut. Der gesamte Pipettiervorgang der PCR fand nach obigem Schema auf Eis statt. Für die Klonierung der Phospholamban-Mutanten waren drei verschiedene PCR-Ansätze nötig.

PCR 1: Mit dem Primer (FLAG) PLN BamF + dem *reversen* Primer mit Mutation.

PCR 2: Mit dem Primer PLN RIR + dem *forward* Primer mit Mutation.

Die beiden PCR-Produkte wurden 1 : 100 verdünnt und gleiche Meng pipettiert. 2 µl von diesem Mix waren das Template für PCR 3.

PCR 3: Die Primer waren immer (FLAG) PLN-BamF + PLN-RIR

Bei PCR 1 und PCR 2 wurden die Templates, die beide die Mutation der Mutante tragen, generiert und in PCR 3 zusammengeführt.

Für die Gelaufreinigung des PCR Produkts wurde ein 1 %iges Ethidiumbromid-Agarosegel mit großen Taschen verwendet. Als Höhenstandard diente der 100 bp - 1 kb Marker. Zur Beladung der Gele wurden die Proben mit 10x Ladebuffer versetzt. Die Darstellung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) über Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids. Zur Extraktion des gereinigten PCR Produktes wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und der *QIAquick Gel Extraction Kit*® nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 43 µl Millipore Wasser.

Restriktionsverdau des PCR-Gesamtansatzes 50 µl (n= 1)

Mit PCR 3 waren Restriktionsenzym-Schnittstellen an beide Enden des PCR-Produktes angefügt worden. Sie wurden im nachfolgenden Schritt für die Klonierung des PCR-Produktes in den Expressionsvektor verwendet. Der Verdau der PCR Produkte oder der Plasmid-DNA erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffer.

<b>Insertverdau:</b>		<b>Vektorverdau:</b>	
BSA (100x)	0,5 µl	BSA (100x)	0,5 µl
NEB Puffer 3	5 µl	NEB Puffer 3	5 µl
Bam HI (NEB)	1 µl	Bam HI (NEB)	1 µl
Eco RI (NEB)	1 µl	Eco RI (NEB)	1 µl
+43 µl Eluat der Gelaufreinigung		+3 µl pcDNA3 (1 µg/ µl) + 39 µl Wasser	

Die Inkubation erfolgte über 90 min bei 37 °C im Wasserbad.

Im Anschluss wurden die geschnittenen Produkte mittels Gelaufreinigung unter Verwendung des gleichen Protokolls wie zuvor nach PCR 3 extrahiert.

#### Ligation von DNA für 10 µl Gesamtansatz (n= 1)

pcDNA3	1 µl
Insert	1 µl
Ligase	1 µl
Ligase-Puffer	1 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl

Die Ligation der DNA Fragmente wurde mit T4-DNA-Ligase in wässriger Lösung nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Thermomixer ruhen gelassen, dabei nicht schütteln.

## **2.3.2 Generierung und Transformation kompetenter Bakterien**

### **2.3.2.1 Generierung kompetenter Bakterien**

Kompetente E.coli (Stellar, Top 10) Bakterien wurden auf LB-Agar-Zellkulturschalen ohne Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Zur

Herstellung einer Vorkultur überführte man eine einzelne Bakterienkolonie von der Agarplatte in 50 ml LB-Medium. Diese Vorkultur wuchs über Nacht bei 37 °C im Schüttler wieder hoch. 250 ml LB-Medium wurden mit 4,5 ml der Vorkultur infiziert und wieder bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von OD 0,4 - 0,6 bei 595 nm wurden die Zellen bei 3400 x g 10 min abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in frisch angesetztem TSB resuspendiert und in Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die so generierten kompetenten E.coli wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.3.2.2 Chemische Transformation kompetenter E.coli Bakterien mittels KCM-**

#### **Methode**

10 – 20 µl Ligationsansatz oder 1 – 2 µl fertige DNA wurden mit 100 µl kompetenten E.coli Bakterien und 100 µl 1x KCM (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.1) für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend entnahm man das Gemisch aus dem Eis, um es nochmals 10 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. In einem Röhrchen wurde 1 ml LB-Medium vorgelegt, zu dem der Transformations-Ansatz zugefügt und das Gemisch bei 37 °C 45 min im Schüttler inkubiert wurde. Bei einer neuen Klonierung wurde anschließend der Transformations-Ansatz abzentrifugiert (2000 x g, 5 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und auf Agarplatten, die mit Ampicillin versetzt waren, ausplattiert. Das genetische Konstrukt verlieh den erfolgreich transformierten Bakterien Resistenz gegen Ampicillin. Bei 37 °C im Brutschrank konnten sich die transformierten Zellen vermehren und wuchsen zu Kolonien heran.

### **2.3.3 Kultivierung und Pflege von HEK293AD- und HEK293T-Zellen**

HEK293AD und HEK293T wurden bei 7 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-Medium mit (Fetal Calf Serum) FCS, L-Glutamin und (Penicillin/Streptomycin) Pen/Strep als Zusätze (siehe Material

und Methoden Kapitel 2.2.1). Zur homogenen Aufteilung wurden die zwischen 70 – 80 % konfluenten Zellkulturschalen dem Brutschrank entnommen und unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit sterilem (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) DPBS gewaschen um Reste des Mediums sowie Stoffwechselprodukte der Zellen vollständig zu entfernen. Nach Absaugen des DPBS lösten sich die adhärennten Zellen anschließend mit Trypsin/ EDTA-Lösung, einer Protease, von der Platte ab. Nach 1 min wurde die Trypsin/ EDTA-Lösung mit frischem Medium inaktiviert und die Zellen einer Zellkulturschale auf fünf neue Zellkulturschalen verteilt. Sobald die Zellen nach etwa zwei Tagen wieder dicht gewachsen waren, wurde der Vorgang wiederholt.

### **2.3.3.1 Kryokonservierung von HEK293AD- und HEK293T-Zellen**

Um Zellen längere Zeit zu lagern werden diese eingefroren und können in flüssigem Stickstoff (-196 °C) über viele Jahre sicher aufbewahrt werden. Um optimale Einfrierbedingungen zu haben, wurde ein Einfriermedium verwendet mit speziellen kryoprotektiven-Zusätzen wie z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid). DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und schützt somit die Zellen vor möglichen Gefrierschäden. Ein höherer Anteil an fötalem Kälberserum (FCS) im Einfriermedium schützt die Zellen zusätzlich.

Zur Vorbereitung auf das Einfrieren wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und trypsiniert, in etwas Kulturmedium resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß bei 110 x g, 3 min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 3ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellzahl betrug etwa  $10^6$  Zellen pro ml Suspension. In jedes vorgekühlte Kryoröhrchen (spezielle Gefäße zum Einfrieren der Zellen) wurde 1 ml der Zellsuspension überführt, das Röhrchen fest verschlossen und in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox für etwa 2 Stunden bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C gelagert. Schlussendlich wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt und bis zur Verwendung gelagert.

### **2.3.3.2 Auftauen von HEK293AD- und HEK293T-Zellen**

Die Gefäße mit den aufzutauenden Zellen wurden aus dem Stickstoff-Tank entnommen und sofort kurz angeschraubt, um den im Gefäß herrschende Druck zu entlassen. Die Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut und in 10 ml warmem Medium auf einer Zellkulturschale resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 110 x g 7 min abzentrifugiert, der DMSO-haltige Überstand (vom Einfriermedium; siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.3.1) entfernt und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Dieser Schritt war sehr wichtig, da das DMSO des Einfriermediums bei längerer Exposition eine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Die Zellen wurden komplett auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und zwei Tage bis zur Konfluenz inkubiert.

### **2.3.4 Transfektion von HEK293AD- und HEK293T-Zellen**

#### **2.3.4.1 nach Kalziumchlorid-Methode**

Zur Transfektion der HEK293AD- sowie HEK293T-Zellen wurde die Kalziumchlorid-Methode nach Chen verwendet (Chen and Okayama, 1987). Dies stellt eine chemische Transfektions-Methode mit dem Prinzip der Kalzium-DNA-Präzipitat-Bildung dar. Die Kalzium-DNA-Präzipitate werden im Medium von den Zellen über Phagozytose aufgenommen und anschließend wird die Plasmid-DNA in die zelleigene DNA eingebaut. Hierbei wurden Wasser, DNA und Calciumchlorid vorgelegt und zum Schluss 2x BBS-Lösung (BES-Buffered-Saline) zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde zum Auslösen der Präzipitat-Bildung gut geschüttelt. Das Gemisch ruhte zur Präzipitatbildung für 20 min. Die Zellen wurden 4 – 6 Stunden vor der Transfektion homogen auf neue Zellkulturschalen verteilt, so dass sie anschließend für die Transfektion eine Ausgangsadherenz von 60 – 70 % aufwiesen. Nach Erhalt des Transfektionsmediums inkubierten die Zellen für 48 Stunden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Inkubator, bevor die Zellen für weitere Versuche verwendet werden konnten. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde bei jeder Durchführung eine Kontroll-

Transfektion mit (Cyan Fluorescent Proteins) CFP-PLN mitgeführt. Anhand der Fluoreszenz von CFP, bei 436 nm in nach 48 Stunden erfolgreich transfizierten Zellen, konnte am Mikroskop die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden. Die Transfektionseffizienz betrug 60 - 80 %.

#### **2.3.4.2 Aufteilung der Zellen 48 Stunden nach Transfektion**

48 Stunden nach Transfektion wurden für alle Versuche mit Forskolin-Stimulation die Zellen von fünf Zellkulturschalen (à 20 cm) auf 16 Zellkulturschalen (à 5 cm) homogen aufgeteilt. Dafür wurden die 16 Zellkulturschalen jeweils mit Poly-D-Lysine (0,1 mg/ ml) für 20 min unter Lichtausschluss beschichtet um später eine verbesserte Adhärenz der Zellen zu erreichen. Das Transfektions-Medium der 20 cm Zellkulturschalen wurde abgenommen und die Zellkulturschalen 6x mit 20 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von je 4 ml Trypsin/ EDTA-Lösung abgelöst. Mit 6 ml Medium wurde die Aktivität der Trypsin/ EDTA-Lösung abgestoppt und die Zellen aller fünf Zellkulturschalen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführten. Nach vorsichtigem Homogenisieren der Zellsuspension wurden die Zellen gleichmäßig auf die 16 kleineren Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen inkubierten nochmals bis zur Adhärenz über Nacht im Brutschrank bei 7 % CO<sub>2</sub> und 37 °C. Am nächsten Tag konnten dann die zeit- und konzentrationsabhängigen-Phosphorylierungsversuche durchgeführt werden (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.4.3)

#### **2.3.4.3 Stimulation der Zellen mit Forskolin**

DMEM (ohne weitere Zusätze) sowie DPBS wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Eine frisch hergestellte 100 µM Forskolin-Stammlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde für alle weiteren Verdünnungen in DMEM verwendet. Für die zeitabhängige-Stimulation mit gleicher Menge an Forskolin im Medium wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß warmes DMEM vorgelegt und die Forskolin-Stammlösung zugegeben, so dass im Stimulationsmedium

anschließend eine Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  Forskolin gegeben war. Für die zeitabhängige Kinetik wurden die transfizierten 5 cm Zellkulturschalen einzeln dem Brutschrank entnommen, das Medium entfernt und die Zellen mit 2x 3 ml warmem DPBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml des warmen Stimulationsmediums vorsichtig zugegeben und bei 37 °C im Brutschrank jeweils für 15 s, 30 s, 1 min, 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min inkubiert. Eine Zellkulturschale mit entsprechender Menge DMSO im Medium ohne Forskolin diente als Kontrolle. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Reaktion schnell mit 500  $\mu\text{l}$  1x Lämmli abgestoppt und die Zellen 20 min auf Eis lysiert. Des Weiteren wurden die Lämmli-Zell-Lysate wie unter Kapitel 2.3.5.1 beschrieben behandelt.

Für die konzentrationsabhängige Stimulation der transfizierten Zellkulturschalen wurde in 15 ml Reaktionsgefäße 6 ml warmes DMEM (ohne weitere Zusätze) vorgelegt und anschließend Forskolin-Stammlösung zugegeben, so dass eine Forskolin-Endkonzentration von 0,025  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,75  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 10 $\mu\text{M}$  in der Lösung vorlag. Die Zellkulturschalen wurden wieder einzeln aus dem Brutschrank entnommen, 2x mit 3 ml warmem DPBS gewaschen und anschließend mit jeweils 3ml der entsprechenden Forskolin-Konzentration über 4 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Entfernung des Stimulationsmediums und Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  1x Lämmli-Puffer sofort gestoppt. Die Zellen wurden zur Lyse 20 min auf Eis gebracht. Im weiteren Verlauf wurden die Lämmli-Zelllysate wie unter Kapitel 2.3.5.1.sowie 2.3.5.3 beschrieben weiter behandelt. Pro Probe wurden 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein in die Taschen eines 15 %igen *SDS-Page* Gels geladen und nach Standardprotokoll für *SDS-PAGE* und *Western blot* (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.6 und 2.3.7) verfahren. Zur Detektion des Phosphorylierungsstatus wurde der anti-phospho-PLN(Ser16) Antikörper und zur Detektion der gesamten PLN-Menge der anti-PLN A1-Antikörper verwendet.

### 2.3.5 Lysieren der HEK293AD-Zellen

#### 2.3.5.1 mit 1x Lämmli-Lysepuffer

Transfizierte HEK293AD-Zellkulturschalen (10 cm) wurden dem Brutschrank entnommen, 2x mit 5 ml 37 °C warmem DPBS gewaschen, mit 1 ml 1x Laemmli-Puffer lysiert und sofort auf Eis gestellt. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen 20 min im Kühlraum geschwenkt. Anschließend wurden die Lysate mit einer Pipette und gestopften Spitzen von der Zellkulturschale in auf Eis vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Rundboden überführt, auf Eis sonifiziert und bei 8000 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein kleiner Anteil des Lysates wurde 1 : 3 verdünnt und die Proteinmenge mittels *BCA-Protein-Assay-Kit*® (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.5.3) bestimmt.

#### 2.3.5.2 mit DPBS-Erntelösung

Proteine, welche für weitere Versuche benötigt wurden, konnten durch eine einfache DPBS-Ernte mit Hilfe eines Zellschabers gewonnen werden. Dazu entnahm man die transfizierten HEK293AD-Zellkulturschalen aus dem Brutschrank und stellte sie sofort auf Eis. Die Zellkulturschalen wurden 2x mit 5 ml eiskaltem DPBS gewaschen und erntete die Zellen mit einem Zellschaber und 1 ml DPBS-Erntelösung, der Protease-, Phosphatase- und PMSF-Lösung zugesetzt war. Die Zellsuspension wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, auf Eis sonifiziert und bei 8000 x g, 4 °C und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Anteil 1 : 3 verdünnt, der für die anschließende Proteinmengenbestimmung mit Hilfe des *BCA-Protein-Assay-Kits*® (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.5.3) verwendet wurde.

### 2.3.5.3 Bestimmung der Proteinmenge mittels *BCA-Protein-Assay-Kit*® (Thermo Fisher Scientific)

Die Proteinmenge der HEK293AD–DPBS- oder HEK293AD-Lämmli-Lysate sowie der Mausherz-Lysate und Mausherz-Rohmembranen wurden alle mittels *BCA-Protein-Assay-Kit*® der Firma Thermo Fisher Scientific, entsprechend des beiliegenden Protokolls bestimmt. Dabei diente eine (Bovine-Serum-Albumin) BSA-Standardreihe als Referenz zur Bestimmung der Proteinmengen.

### 2.3.6 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die *SDS-PAGE*-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden Proteine nach Größe und Ladung aufgetrennt. Vor dem Zusammenbau der Gelkammer wurden die Glasscheiben, die Abstandshalter (*Spacer*) und Klammern mit 70 % Ethanol gründlich gereinigt. Anschließend wurden die Teile entsprechend zusammengesetzt, festgeschraubt und in die Gießstation eingespannt. Auf den Glasscheiben wurde mit Edding die Füllhöhe (6 cm) für das Trenngel markiert. Das Trenngel wurde im Becherglas angesetzt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.4), mit TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) aktiviert und mit Hilfe einer Glaspipette zwischen die Scheiben gegossen. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern und störende Luftblasen zu entfernen wurde folgend mit 1 ml Millipore Wasser überschichtet. Das Gel benötigte ca. 30 min bis zur vollständigen Polymerisation. Mit Hilfe von Filterpapierstücken wurde der Wasserüberstand entfernt und die Kämme für die Taschenbildung eingesetzt. Der Abstand zwischen Kammspitze und Trenngelfront betrug ca. 1 cm, um eine ausreichende Sammlung der Probe zu gewährleisten. Nun wurde das Sammelgel, welches 4 % Acrylamid beinhaltete, gegossen und wieder ca. 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. Die Kämme wurden in einem festen Zug aus dem Sammelgel gezogen, die Gelkammer in die Laufapparatur eingespannt und diese in die mit 1x SDS-Laufpuffer befüllte Laufkammer gesetzt. Die Laufapparatur

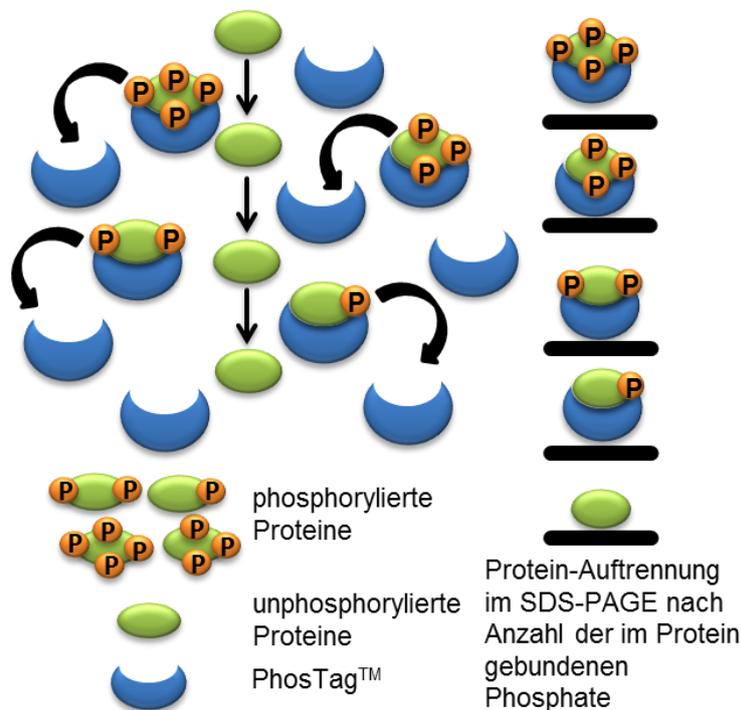
wurde ebenfalls mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt, so dass der Draht der Kammer vollständig mit Puffer bedeckt und die optimale Stromversorgung gewährleistet war. Die Geltaschen wurden mit speziellen Pipettenspitzen zur Beladung von *SDS-PAGE* Gelen befüllt. Dabei wurden standardmäßig immer 10 µl Höhenmarker in die erste linke Tasche gegeben und alle Proben in die folgenden Taschen von links nach rechts geladen. Anschließend wurde der Deckel der Kammer aufgesetzt und das Spannungsgerät angeschlossen. Für die optimale Auftrennung der Gele wurden grundsätzlich 80 V durch das Sammelgel und 150 V nach Erreichen des Trenngels angelegt.

### 2.3.6.1 Spezielle Gelelektrophorese: *PhosTag*<sup>TM</sup>

*PhosTag*<sup>TM</sup> [1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olatodizinc(II)complex] ist ein spezielles Reagenz welches unter physiologischen Bedingungen an anionische Substituenten am Protein, bevorzugt Phospho-monoester-dianionen, bindet. Es trennt somit Proteine nicht nach Ihrer Größe sondern nach Ihrem Phosphorylierungsstatus auf. Kinoshita et al etablierte den *PhosTag*<sup>TM</sup> Mangan-Komplex im *SDS-PAGE*-Verfahren um Verschiebungen der Mobilität von Phospho-Proteinen im Vergleich zu Ihren nicht phosphorylierten Gegenstücken sichtbar zu machen. Das Prinzip beruht auf der Affinität des *PhosTag*<sup>TM</sup> zum Phospho-Protein. Je mehr Phosphorylierungen ein Protein trägt desto höher sind die Interaktionen von *PhosTag*<sup>TM</sup> und Phospho-Protein, die Geschwindigkeit der Migration des Proteins durch das Gel nimmt somit ab. Besitzt ein Protein keine Phosphorylierung, wird seine Migration durch das Gel nicht gebremst (**Abb. 7**) (Kinoshita et al., 2006; Kinoshita et al., 2012).

Um eine ausreichend Komplexbildung zu gewährleisten wurde *Phostag*<sup>TM</sup> (25 µM) in gleicher Menge wie Manganchlorid (25 µM) in das Standardtrenngel-Rezept eingefügt. Die *SDS-PAGE* Gelelektrophorese lief anschließend nach Standardprotokoll ab. Nach Ende der Auftrennung wurde das Gel in einer Lösung aus Transblot-Puffer und 1 mM EGTA unter

schwenken 10 min inkubiert, so dass das im Gel befindliche Manganchlorid durch EGTA komplexiert wurde. Manganchlorid stört den Vorgang des Protein-Transfers vom Gel auf die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) (sog. Blotting), was somit zu einem ungenügenden Blot-Ergebnis führen würde. Nach der Manganchlorid-Komplexierung wurde das Gel nochmals 3x 5 min in reinem Transblot-Puffer gewaschen und anschließend das *Western blot* Experiment nach Standardprotokoll durchgeführt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.7).



**Abb. 7: Prinzip der Protein-Trennung im *PhosTag*<sup>TM</sup>-SDS-Polyacrylamid-Gel**

*PhosTag*<sup>TM</sup>, ein zweiwertiger Mangan-Komplex besitzt eine hohe Affinität zu Phosphat-Gruppen von Proteinen. Gebunden an das Acrylamid im SDS-Gel trennt dieser Komplex Proteine nicht nach Ihrer Größe sondern nach Ihrem Phosphorylierungs-Level auf. Dabei laufen unphosphorylierte Proteine schneller durch das Gel als Proteine die mehrere Phosphorylierungen tragen.

### **2.3.7 Western blot**

Während der Gellaufzeit wurden je Gel eine (Polyvinylidenfluorid) PVDF-Membran sowie sechs Lagen Filterpapier entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Um einen bestmöglichen Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran zu gewährleisten, wurden in einer mit Transblot-Puffer befüllten Wanne die *Western blot*-Transferkassette inklusive der *blot*-Schwämme, die zugeschnittenen Filterpapiere sowie die zuvor in 100 % Methanol aktivierte PVDF-Membran eingeweicht. Sobald die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurden die Gelkammern aus den Laufkammern genommen und das Sammelgel vorsichtig abgelöst. Links unten am Ende des Gels, wurde zur Orientierung die Ecke des Gels entfernt. Nun erfolgte der *blot*-Aufbau. Das Gel wurde mittig in der *blot*-kassette, die abgeschnittene Ecke des Gels links unten liegend, auf einen Stapel von einem *blot*-Schwamm und den ersten 3 Filterpapieren gelegt, mit der Membran überdeckt (der auch links unten die Ecke fehlt) und leicht glatt gestrichen, so dass keine Luftblasen den *blot*-Vorgang stören konnten. Zum Schluss wurde die Membran wieder mit 3 Filterpapieren und dem letzten *blot*-Schwamm bedeckt, die *blot*-Kassette verschlossen und in den mit frischem Transblot-Puffer und gefrorenem Kühl-Akku befüllten Tank überführt. Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 100 V 60 min im Kühlraum. Während des Transfers wurde die Blockmilch hergestellt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.4).

#### **2.3.7.1 Blocken und Inkubation der Antikörper**

Nach Ende des Proteintransfers wurden die Kassetten aus der Kammer genommen und die Membranen für 2 Stunden in 30 ml Standardblockmilch (5 %) unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Blockmilch entfernt, 20 ml des Erst-Antikörpers (Verdünnungen siehe Material und Methoden Kapitel 2.1.3) zugegeben und im Kühlraum (4 °C) unter schwenken über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Erst-Antikörper wieder zurück in Ihre Reaktionsgefäße gegeben und sofort wieder bei -20 °C eingefroren oder im Kühlschrank gelagert. Die Antikörper konnten ca. 3 - 5x verwendet

werden. Die Membranen wurden 6x 5 min mit Waschpuffer unter schwenken gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper (HRP-konjugiert; 1 : 10000) in Waschpuffer 60 min unter Bewegung auf dem Schwenktisch inkubiert. Danach wurden die *Western blot*-Membranen wieder 6x 5 min gewaschen und mit 10 ml Luminata (HRP-Substrat) unter schwenken 5 min aktiviert. Zwischen Folien in der Entwicklerkassette fixiert wurden die Membranen in der Dunkelkammer mit Röntgenfilm, Entwickler und Fixierer entwickelt.

### **2.3.7.2 Blocken und Inkubation der Antikörper mit der SNAP i.d von Millipore**

Die Membranen wurden nun in die zuvor mit Millipore-Wasser befeuchteten SNAP *Midi Blot Holders* (hydrophile Membran-Vorrichtung, in die die *Western blot*-Membran zum Schutz eingefügt wird) eingelegt und diese in die vorgesehen Rahmen der SNAP i.d. eingespannt. Vakuum wurde über die an die SNAP i.d. angeschlossene Pumpe angelegt und die Membranen mit 30 ml SNAP-Blockmilch (0,1 % Milchpulver) unter Vakuum-Durchfluss geblockt. Anschließend wurden die Membranen wieder aus den Vorrichtungen und *den Midi Blot Holders* genommen und über Nacht im Kühlraum im Erst-Antikörper (Verdünnungen siehe Material und Methoden Kapitel 2.1.3) unter schwenken inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen wieder in die *Midi Blot Holders* im Rahmen eingespannt und mit 4x 30 ml Waschpuffer bei angelegtem Vakuum gewaschen. Anschließend wurden 8 ml Zweit-Antikörper (HRP-konjugiert; 1 : 10000) in Waschpuffer pro Membran aufgetragen, 10 min in der SNAP-Vorrichtung inkubiert und anschließend mit Vakuum 10 s durchgesaugt. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschgang mit 4x 30 ml Waschpuffer. In 10 ml Luminata (HRP-Substrat) wurde die Membran 5min unter schwenken aktiviert, zwischen zwei Folien in eine Entwicklungskassette gelegt und mit Hilfe von Röntgenfilm, Entwickler- und Fixierer-Lösung in der Dunkelkammer entwickelt.

### **2.3.8 Tierexperimente (Mäuse)**

#### **2.3.8.1 Generierung der transgenen Mäuse**

In dieser Arbeit kamen Mäuse zum Einsatz, die entweder Wildtyp-PLN oder AFA-PLN unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors in vergleichbarer Stärke kardial überexprimierten. Sie waren vom 1. Betreuer dieser Arbeit generiert und zur Verfügung gestellt worden.

Transgene Tiere wurden mit PLN-defizienten Mäusen über zwei Generationen gekreuzt um den Verlust der endogenen PLN-Expression zu erreichen (Luo *et al.*, 1994). Transgene Mäuse für AFA-PLN exprimierten dadurch PLN ausschließlich als Monomer. Alle Mäuse wurden im genetischen FVB/N Hintergrund (Harlan) gezüchtet und in der institutseigenen SPF (specific pathogen free)-Tierhaltung gehalten. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche waren zuvor von der Regierung von Unterfranken unter dem Aktenzeichen Az. 55.2-2531.01-20/10 genehmigt.

#### **2.3.8.2 Dobutamin-Stimulation der Mäuse**

Zur PLN-Phosphorylierung mit Dobutamin wurden die Mäuse zunächst durch eine interperitoneale Injektion von Pentobarbital (50  $\mu$ g/ g) Körpergewicht in tiefe Narkose versetzt. Auf einer Wärmeplatte (40 °C) wurde die linke Vena jugularis präpariert und mit einem Venenkatheter intubiert zur intravenösen Applikation von Dobutamin. 3 min nach Applikation einer maximalen Dosis von Dobutamin 3,75  $\mu$ g/ min wurden die Mäuse durch zervikale Dyslokation euthanasiert und die Herzventrikel entnommen, kurz in DPBS gespült und innerhalb einer Minute in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Gewebeproben zusammen mit unstimulierten Mäuseherzen bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.3.8.3 Rohmembran-Präparation aus Mausherzen**

Die beiden Puffer, Präparations- und Aufbewahrungspuffer (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.5), wurden am Verwendungstag frisch hergestellt und maximal 5 Tage im

Kühlschrank gelagert. Die Herzen wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank direkt in flüssigen Stickstoff gegeben um die Kühlkette nicht zu unterbrechen, bis sie anschließend auf Eis mit eisgekühlten Lösungen verarbeitet wurden. Rundboden-Reaktionsgefäße wurden beschriftet und auf Eis vorgekühlt. Pro Präparation benötigte man zu Beginn drei beschriftete Reaktionsgefäße. Zur Herstellung der Herzlysate wurden 600 µl eiskalter Präparationspuffer auf Eis vorgelegt und das in Stickstoff aufbewahrte Herz dazugegeben. Unter Kühlung wurde dann mit dem Ultra Turrax (T10 basic IKA) auf maximaler Leistungsstufe das Herz homogenisiert. 50 µl des Homogenats wurden mit 50 µl des Aufbewahrungspuffers auf Eis vermischt. Von dieser Lösung wurde eine 1 : 20 Verdünnung für die anschließende Proteinmengenbestimmung hergestellt und der Rest der Mischung sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der Ultra Turrax wurde nach jedem Herzen in zwei mit Millipore Wasser befüllten Bechergläsern gereinigt, um eine Verunreinigung mit fremdem Herzgewebe der vorherigen Präparation, zu vermeiden. Die Herzlysate wurden anschließend bei 4 °C und 8000 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in Ultrazentrifugationsröhrchen (max. 2 ml Volumen) überführt, in den vorgekühlten Rotor (TLA 100.2 Beckmann Coulter) gesetzt und bei 100000 x g, 4 °C unter Vakuum 30 min zentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das entstandene Rohmembranpellet in 200 µl eiskaltem Aufbewahrungspuffer vorsichtig erst mit 1000 µl Spitzen durch vorsichtiges auf- und abziehen resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bei noch nicht vollständig resuspendierten Rohmembranfragmenten wurde der Vorgang mit gestopften 200 µl Spitzen wiederholt. Ein kleiner Anteil der homogenen Rohmembransuspension wurde 1 : 20 verdünnt und ebenfalls für die Proteinbestimmung mittels *BCA Protein Assay Kit*® (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.5.3) verwendet. Im Folgenden wurden die Rohmembransuspensionen auf eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/ µl eingestellt, je nach Verwendungszweck, verschieden große Aliquots (20 – 100 µl) angefertigt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Verwendung waren die Rohmembranen im -80 °C Gefrierschrank stabil.

### **2.3.9 Rohmembranpräparation aus transfizierten HEK293AD-Zellen**

Sechs HEK293AD-Zellkulturschalen (à 10 cm) pro Mutante wurden nach Standardmethode transfiziert (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.4.1) und nach 48 Stunden zur Rohmembranpräparation herangezogen. Die Zellkulturschalen wurden aus dem Brutschrank direkt auf Eis gestellt. Das Medium der Zellkulturschalen wurde abgesaugt und jede Platte wurde mit 3x 5 ml eiskaltem DPBS gewaschen. Mit 10 ml eiskaltem DPBS und einem Zellschaber wurden die Zellen der sechs Zellkulturschalen in ein vorgekühltes 15 ml Reaktionsgefäß geerntet. Bei 4 °C und 400 x g wurden die Zellen 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 0,9 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer mit 10 µl Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) resuspendiert und auf Eis sonifiziert. Das Homogenat wurde in Mikrozentrifugen Gefäße überführt und bei 600 x g 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt Nuclei und Zellfragmente, welche verworfen wurden. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsgefäße (Beckmann Coulter) überführt und bei 100000 x g und 4 °C 60 min (im Rotor T<sub>i</sub>170 Beckmann Coulter) zentrifugiert. Das entstandene Microsomen-Pellet wurde in 100 µl Suspensions-Puffer und 1 µl Proteaseinhibitor-Cocktail suspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Standard BCA-Methode (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.5.3) bestimmt, die Microsomen auf eine Konzentration von 1 µg/ µl eingestellt, in Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff tiefgefrohren. Die Microsomen waren im -80 °C Gefrierschrank stabil und wurden dort bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **2.3.10 NADH-abhängiges enzymgekoppeltes SERCA2a-Aktivitätsexperiment**

Der NADH-abhängige enzymgekoppelte SERCA2a-Aktivitäts-Versuch wurde von Chu et al. 1988 (Chu *et al.*, 1988) etabliert und von Münch et al (Münch *et al.*, 2002) auf die Aktivitätsbestimmung von SERCA2a aus humanem Herzgewebe weiterentwickelt. Bei diesem Experiment entsteht durch die Aktivität der SERCA2a, unter Energieverbrauch aus ATP (Adenosintriphosphat) ADP (Adenosindiphosphat). Die Pyruvatkinase (PK) wandelt

unter Zuhilfenahme des Phosphoenolpyruvates (PEP), das schließlich zu Pyruvat umgewandelt wird, das ADP wieder in ATP um. Über das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) wird schließlich durch den NADH-Verbrauch das entstandene Pyruvat in Laktat umgewandelt. Somit ist die Abnahme der NADH-Absorption äquivalent zum ATP Verbrauch der SERCA2a und lässt Rückschlüsse auf die Aktivitätseigenschaften der SERCA2a zu.

Der HEPES-Puffer pH 7,4 wurde am jeweiligen Versuchstag frisch hergestellt. Ebenso wurden PEP und NADH abgewogen und frisch in Millipore Wasser gelöst, da diese Substanzen sehr empfindlich sind und bei längerer Aufbewahrung zur Zersetzung neigen. Die ATP-Stammlösung pH 7 konnte einmalig hergestellt und in Reaktionsgefäße aufgeteilt werden. Bei -20 °C blieb eine wässrige ATP-Lösung stabil. Anschließend wurde der HEPES-Mix, der für den eigentlichen Versuch nötig war, auf Eis mit allen Bestandteilen frisch gemischt und kurz vor Verwendung der entsprechende Enzym-Mix (mit LDH und PK), zugegeben und vorsichtig durch invertieren gut gemischt (nicht vortexen!). Zeitgleich wurden die Rohmembranen dem -80iger Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Mit der 2,5 µl-Pipette und den *low-bind* Spitzen (Biozym) wurden 1,2 µl (3,125 µg) der Rohmembranen pro Well in die auf Eis vorgekühlte 96-well Reaktions-Platte aufgeteilt. Anschließend wurde mit einer elektronischen Eppendorf Multipette 243,8 µl/ well HEPES Mix pH 7,4 zugegeben. Kurz vor Messstart wurden 5 µl ATP-Lösung pro Well hinzugefügt und die Platte sofort in das auf 30 °C vorgewärmte Photometer (Envision Multiplate Reader (Perkin Elmer)) gestellt. Dabei wurde die Absorption jede Minute bei 340 nm Wellenlänge gemessen. Die Reaktion startete nach ca. 10 min Messzeit, was am Abfall der NADH-Absorptionskurve deutlich zu erkennen war. Die Reaktion besaß ihre maximale und homogene Geschwindigkeit zwischen 20 und 30 min. Spätestens nach 40 – 45 min war die Reaktion am Ende angelangt, was an den gleichbleibenden Absorptionswerten zu erkennen war. Jede Rohmembran wurde in drei Wells unabhängig voneinander gemessen, wobei bei jedem Messzeitpunkt der Mittelwert aller drei Wells berechnet wurde, der anschließend zur Kurvenkalkulation und folgender SERCA2a-Aktivitätsberechnung herangezogen wurde.

Um sicher zu gehen, dass der Versuchsansatz zur Messung der SERCA2a-Enzymaktivität keine weiteren ATPasen miteinbeziehen konnte wurde die Spezifität des Experiments mit Hilfe von Thapsigargin (TPG) überprüft. Hierfür wurden Rohmembranen mit steigenden Mengen an TPG (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) versetzt und anschließend wie im oberen Abschnitt beschrieben die SERCA2a-Enzymaktivität gemessen. Die Spezifität des TPG wurde auch mit Hilfe der Apyrase nochmal überprüft. Dabei wurde die Apyrase mit hohen Mengen an TPG (50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) versetzt und ebenfalls wie im oberen Absatz beschrieben die Apyrase-Enzymaktivität gemessen.

Durch Einsetzen verschiedener Rohmembran-Mengen oder verschiedener Mengen an Apyrase und anschließender Messung der SERCA2a bzw. Apyrase-Enzymaktivität wurde die Konzentrationsabhängigkeit überprüft und die für die Messung am besten geeignete Menge an Rohmembran ermittelt.

#### **2.3.10.1 Berechnung der SERCA2a-Enzymaktivität**

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach der Methode von Chu et al. (Chu *et al.*, 1988) Dabei ist der ATP-Verbrauch der jeweilig gemessenen SERCA2a-Enzymaktivität umgekehrt proportional zur NADH-Abnahme. Hierzu wurde der linear abfallende Bereich der NADH-Absorptionskurve zwischen 20 – 30 min als Messbereich festgelegt. Für diesen Messbereich wurde die Steigung (m) der NADH-Abnahme über lineare Regression ( $y = mx + b$ ) berechnet. Da dabei ein negativer Wert heraus kam, der ATP-Verbrauch aber umgekehrt proportional dazu war, wurde das Vorzeichen umgedreht. Die Steigung stellte dabei den ATP-Verbrauch und somit die SERCA2a-Enzymaktivität dar. Je steiler die Steigung war, desto aktiver die SERCA2a.

### 2.3.11 Immunpräzipitation (IP) mit Dynabeads® Protein A oder Protein G

HEK293AD-Zellen wurden nach Standardprotokoll (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.4.1) 48 h vor IP-Versuch transfiziert. Dabei wurden jeweils die Zellen der beiden Zellkulturschalen aus einem Transfektions-Ansatz versetzt um eine homogene Transfektion zu erzielen. Am Versuchstag wurde von diesen beiden Zellkulturschalen, eine Platte sofort mit 1x Lämmli lysiert, und nach Standardmethode (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.5.1) aufbereitet. Die zweite Platte wurde auf Eis gestellt und 2x mit 5ml eiskaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach Standardmethode (siehe Material und Methoden 2.3.5.2) verarbeitet. 50 µl der Dynabeads® Protein G oder Protein A wurden jeweils pro Versuchsansatz in Rundboden-Reaktionsgefäße überführt. Der DynaMag™ 2, ein magnetischer Partikelkonzentrator, sorgte für die Ansammlung der *beads* am Gefäßrand in Richtung Magnet, so dass ohne Probleme der Überstand abgesaugt werden konnte. Der Aufbewahrungs-Puffer der *beads* wurde abgenommen und die *beads* anschließend 1x mit 200 µl DPBS + 0,02 % Tween 20 gewaschen. Der Überstand wurde wieder über den DynaMag™ 2 abgesaugt. Anschließend wurden pro IP-Ansatz 5 µl des entsprechenden Antikörpers in 200 µl DPBS + 0,02 % Tween 20 gemischt und zu den *beads* gegeben. Die *beads* wurden unter leichten Hin- und Herschwenken in der Antikörper-Lösung resuspendiert und im Rotationsschwenker 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert um alle *beads* aus dem Deckel zu entfernen und im Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln damit sie über den DynaMag™ 2 konzentriert werden konnten. Die Antikörperlösung wurde abgesaugt, die *beads* mit 200 µl DPBS + 0,02 % Tween 20 durch leichtes Hin- und Herschwenken resuspendiert, gewaschen und die Waschlösung wieder abgesaugt. Für die IP wurden 800 µg Gesamtproteinmenge der HEK293AD-Lysate in 700 – 1000 µl Volumen auf die mit Antikörper beschichteten *beads* geladen. Bei der IP der Herzrohmembranen wurden 500 µg Gesamtrohmembranmenge in 700 µl Volumen auf die mit Antikörper beladenen *beads* gegeben. Die *beads* wurden auch hier durch leichtes hin-und herschwenken in der Proteinlösung resuspendiert (nicht

vortexen), 20 min bei der HEK-Zell-CoIP und 25 min bei der Herz-Rohmembran-CoIP auf dem Rotationsschwenker inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die *beads* wieder kurz anzentrifugiert und über den DynaMag<sup>TM</sup>2 die Proteinlösung abgesaugt. Die *beads* wurden 3x mit 200 µl DPBS + 0,02 % Tween 20 durch vorsichtiges hin- und herschwenken gewaschen und mit 60 µl 1x Lämmli versetzt. Je nach Fragestellung wurden die *beads* entweder schonend zum Erhalt der PLN-Pentamere bei 40 °C, 10 min und 400 rpm im Thermomixer oder bei 70 °C, 10 min und 400 rpm eluiert, wobei hierbei das Pentamer vollständig in Monomere zerfiel. Unter Verwendung des FLAG-Antikörpers stellte sich die Co-IP als sehr effizient heraus, so dass 15 µl des IP-Lysats (mit *beads*) für ein starkes Signal im *Western blot*-Experiment ausreichte. Wohingegen die Co-IP mit SERCA2a-Antikörper (NEB) ein etwas geringeres Potential aufwies, so dass hier 45 µl für den anti-PLN A1-Antikörper im *Western blot*-Experiment und 15 µl für den anti-SERCA2a-Antikörper in der *Western blot*-Analyse nötig war.

## 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit PLN-Pentamere ein Zielprotein der PKA darstellen und wie sich die Phosphorylierungsmuster von Monomeren und Pentameren unterscheiden. Dazu wurden verschiedene PLN-Mutanten generiert und charakterisiert, die in unterschiedlichem Maße Oligomere ausbilden. Die Mutanten wurden in vergleichbaren Mengen in transfizierten HEK293AD-Zellen exprimiert, um anschließend die Phosphorylierungsmuster von Monomer und Pentamer näher zu betrachten. Auch sollten die Auswirkungen der unterschiedlichen Oligomerisierungsgrade sowie deren Phosphorylierungsmuster auf das zu regulierende Protein, die Kalzium-ATPase SERCA2a (*sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase*) mit Hilfe von Enzym-gekoppelten funktionellen Experimenten sowie mit Interaktionsuntersuchungen (Co-Immunpräzipitation) untersucht werden.

### 3.1 Identifizierung der für die PLN-Oligomerisierung verantwortlichen Aminosäuren

Im ersten Schritt wurden verschiedene PLN-Mutanten generiert, die sich in ihrem Monomer-Pentamer-Verhältnis unterschieden. Ziel dabei war die Identifizierung der Aminosäuren, die maßgeblich für die Fähigkeit zur Oligomerisierung des PLN beteiligt sind. Dabei wurden Mutanten generiert, die entweder in ihrem Monomer-Pentamer-Verhältnis dem Wildtyp-PLN ähnelten, also überwiegend Pentamere exprimierten, oder Mutanten verwendet, die ausschließlich als Monomere vorliegen.

Für diesen Versuchsansatz wurden folgende PLN Konstrukte verwendet:

Mutanten, die verstärkt Oligomere bilden:

Wildtyp-PLN

PLN-I45A

PLN-V49A

(Simmerman *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997)

Mutanten mit reduzierter Oligomerbildung:

AFA-PLN

PLN-L37A

PLN-I40A

PLN-C36A

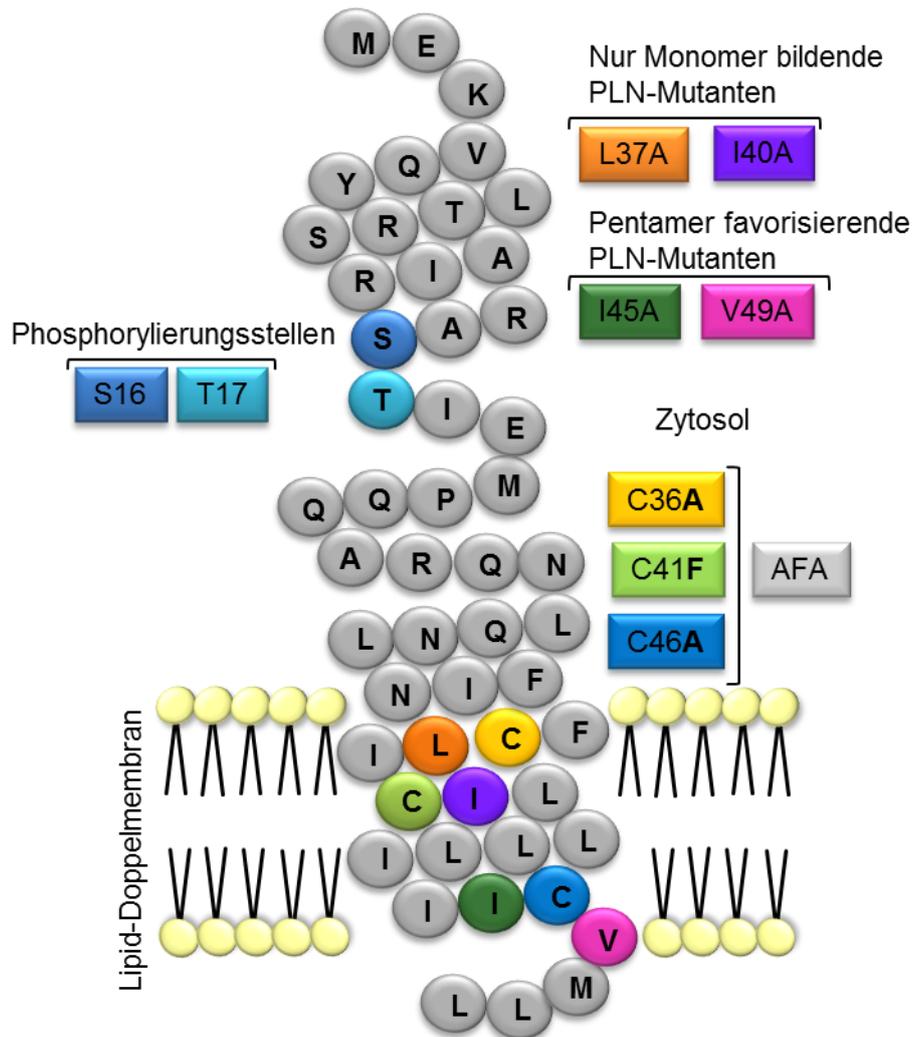
PLN-C41F

PLN-C46A

(Simmerman *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997).

(Zamoon, Mascioni, Thomas, & Veglia, 2003);(Fujii *et al.*, 1989); (Simmerman *et al.*, 1996).

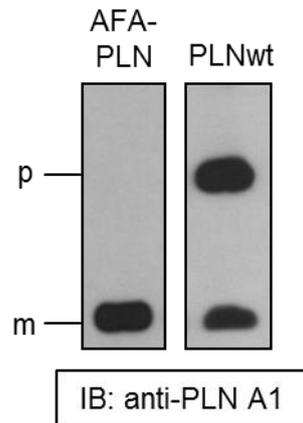
Die genannten Punktmutationen wurden via *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) mit *Primern*, die die mutierten Basen in das DNA-Konstrukt einführten, generiert und nach Protokoll (siehe Material und Methoden Kapitel 2.1.5) aufgereinigt. Die DNA der Mutanten wurde über Kalziumtransfektion (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.4) in HEK293AD-Zellen exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden mit 1x Lämmli-Lysepuffer lysiert und über *SDS-PAGE* (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) und folgenden *Western blot*-Analysen (*Immunoblot*, IB) mit anti-PLN A1-Antikörpern detektiert. Jede der Mutanten wurde einmal mit einer N-terminalen Erkennungssequenz (*FLAG-tag*) (siehe Material und Methoden Kapitel 2.1.5) sowie ohne die Sequenz generiert.



### Abb. 8: PLN-Aminosäuresequenz

Die Sequenz zeigt farblich markiert die Lokalisation der verschiedenen PLN-Punktmutationen in der transmembranären Domäne sowie die im Zytosol angesiedelten Phosphorylierungsstellen Serin16 (S) und Threonin17 (T).

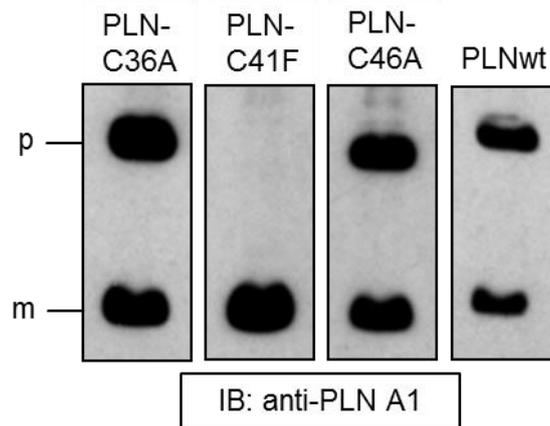
In der voll funktionsfähigen AFA-PLN-Mutante, die ausschließlich Monomere bildet, sind drei Cysteine der Transmembranregion gegen Alanin oder Phenylalanin ausgetauscht (**Abb. 8**). Dieser Austausch führt zur Destabilisierung der Oligomere, was die Ursache für die fehlende Pentamerbildung der Mutante darstellt (AFA = C36A + C41F + C46A) (**Abb. 9**).



**Abb. 9: Der Austausch der drei transmembranären Cysteine führt bei AFA-PLN zur ausschließlichen Expression von PLN-Monomeren.**

Im *Western blot*-Experiment von transfizierten HEK293AD-Zellen zeigte die AFA-PLN-Mutante, dass sie die Fähigkeit zur Oligomerisierung verloren hat. Sie exprimierte ausschließlich PLN-Monomere. IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN; AFA-PLN, PLN-Mutante, bei der drei Cysteine der Transmembranregion gegen Alanin (A) oder Phenylalanin (F) ausgetauscht sind.

Im nächsten Schritt wurden drei weitere Mutanten mit Einzelmutationen generiert, bei denen jeweils nur ein Cystein des transmembranären Bereichs gegen Alanin oder Phenylalanin ausgetauscht wurde (PLN-C36A; PLN-C41F; PLN-C46A) (**Abb. 8**). Die Lokalisation der Einzelmutationen entsprach jeweils der Lokalisation der Mutationen in der Tripelmutante AFA-PLN. Diese Mutationen dienten zur Analyse, inwieweit die einzelnen drei Cysteine zur Auflösung der Pentamerbildung beitragen. Die beiden Mutanten PLN-C36A und PLN-C46A zeigten in *Western blot*-Experimenten, dass die beiden Cysteine als einzelne Mutation gegen Alanin nicht maßgeblich an der Destabilisierung der Pentamerbildung beteiligt sind, sie exprimierten beide PLN-Pentamere (**Abb. 10**). Die einzelne Punktmutation an C41 gegen Phenylalanin dagegen hatte einen gravierenden Effekt auf die Pentamer-Bildung, sie exprimierte ausschließlich PLN-Monomere (**Abb. 10**). Somit konnte mit Hilfe der Einzelmutationen gezeigt werden, dass das Cystein an Position 41 eine tragende Rolle an der Aufhebung der Oligomerisierung in der AFA-PLN-Mutante hat.



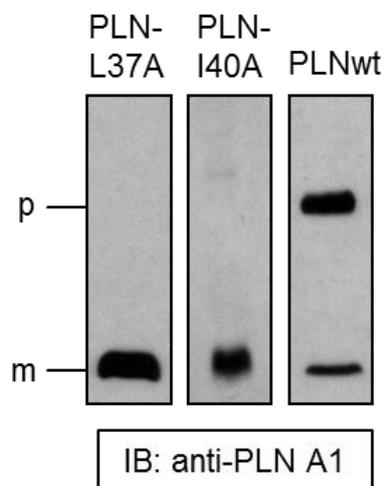
**Abb. 10: Die Punktmutation des transmembranären Cysteins an Position 41 trägt zur Aufhebung der PLN-Oligomerisierung bei.**

Die Punktmutationen an C36 sowie C46 haben keinen Einfluss auf die Oligomerisierungseigenschaften des PLN, sie exprimieren in HEK293AD-Zellen sowohl Monomer als auch Pentamer. Der Austausch des Cysteins an Position 41 gegen Phenylalanin führte zur Aufhebung der Oligomerisierung. Die Mutante konnte ausschließlich Monomere exprimieren. p, Pentamer, m, Monomer; IB, *Immunoblot*, anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN; PLNwt, Wildtyp-PLN; PLN-C36A, PLN-Mutante, bei der das Cystein an Position 36 gegen Alanin ausgetauscht wurde; PLN-C41F, PLN-Mutante, bei der das Cystein an Position 41 gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde; PLN-C46A, PLN-Mutante, bei der das Cystein an Position 46 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Durch den Austausch der drei Cysteinreste in der Transmembranregion konnte gezeigt werden, dass diese Bausteine eine tragende Rolle in der Stabilisierung des Pentamers besitzen. Dabei haben die Einzelmutationen in *Western blot*-Experimenten gezeigt, dass das Cystein an Position 41 eine entscheidende Funktion hinsichtlich der Stabilität des Pentamers einnimmt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch unabhängig von den drei Cysteinresten in der Transmembranregion des PLN die Oligomerbildung vollständig unterdrückt werden kann. Dazu wurden zwei Mutanten generiert, die alle drei Cysteinreste im transmembranären Bereich exprimierten, jedoch einen Austausch des Leucin an Position 37 bzw. des Isoleucin an Position 40 gegen Alanin (PLN-L37A; PLN-I40A) aufwiesen (**Abb. 8**). Diese Aminosäurepositionen wurden als wichtige Bausteine eines „Leucin-Isoleucin-Zippers“

identifiziert, der eine tragende Funktion in der Stabilisierung des Pentamers besitzt (Simmerman *et al.*, 1996). Sowohl PLN-L37A als auch PLN-I40A lagen im *Western blot*-Experiment mit HEK293AD-Zelllysaten ausschließlich als Monomer vor (**Abb. 11**). Diese Mutanten eigneten sich daher in den weiteren Versuchen als Kontrolle, um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen der AFA-Mutante und Wildtyp-PLN nicht aus dem Cystein-Austausch der Transmembranregion resultieren, sondern aus dem Fehlen von PLN-Pentameren.

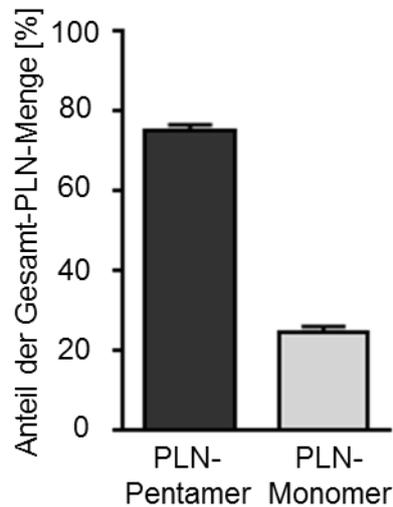


**Abb. 11: PLN-L37A sowie PLN-I40A zeigten ausschließlich die Expression von PLN-Monomeren.**

*Western blot*-Analysen von PLN-L37A sowie PLN-I40A in transfizierten HEK293AD-Zellen zeigten, dass sie ausschließlich als PLN-Monomer exprimiert werden. m, Monomer; IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN; PLN-L37A, PLN-Mutante, bei der das Leucin an Position 37 gegen Alanin ausgetauscht wurde; PLN-I40A, PLN-Mutante, bei der das Isoleucin an Position 40 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Da es keinen bekannten Aminosäureaustausch gibt, der zu einer ausschließlich Pentamer bildenden PLN-Mutante führen könnte, wurden weitere Mutanten generiert, die wie Wildtyp-PLN die Pentamer-Bildung bevorzugen. Diese Mutanten dienten neben Wildtyp-PLN zur Analyse der Phosphorylierungsmuster von PLN-Pentameren sowie von PLN-Monomeren in Anwesenheit von Pentameren. Dabei wurden Valin an Position 49 und Isoleucin an Position

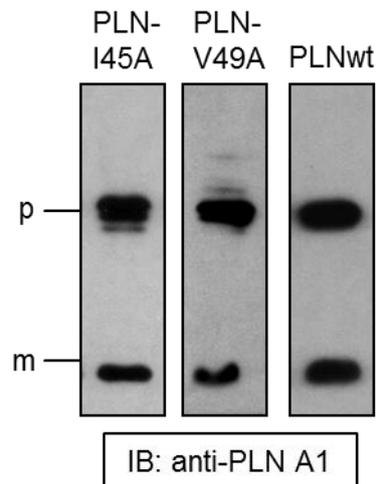
45 gegen Alanin ausgetauscht (PLN-V49A; PLN-I45A) (**Abb. 8**). Im *Western blot*-Experiment zeigte sich im Wildtyp-PLN ein Pentamer-Monomer-Verhältnis von 75 : 25 mit einem SEM (*standard error of the mean*) von 1 (**Abb. 12**).



**Abb. 12: Prozentuale Verteilung von Pentamer und Monomer für Wildtyp-PLN.**

Vier *Western blot*-Experimente mit Wildtyp-PLN aus transfizierten HEK293AD-Zelllysaten, die mit Hilfe von anti-PLN A1-Antikörper durchgeführt wurden, zeigten eine prozentuale Verteilung von 75 % Pentamer und 25 % Monomer in Wildtyp-PLN. Das Säulendiagramm zeigt Durchschnittswerte mit einem SEM von 1.

Auch die beiden PLN-Mutanten PLN-V49A und PLN-I45A erwiesen sich in HEK293AD-Zellen als bevorzugt Pentamer-exprimierende PLN-Mutanten mit etwa gleicher Monomer-Pentamer-Verteilung wie in Wildtyp-PLN (**Abb. 13**).



**Abb. 13: Die Expression der bevorzugt Pentamer-bildenden Mutanten (PLN-I45A; PLN-V49A) zeigte ein ähnliches Monomer-Pentamer-Verhältnis wie Wildtyp-PLN.**

Transfizierte HEK293AD-Zellen, die die bevorzugt Pentamer-bildenden Mutanten PLN-I45A sowie PLN-V49A exprimierten, zeigten im *Western blot*-Experiment ein ähnliches Monomer-Pentamer-Verhältnis wie Wildtyp-PLN (PLNwt). p, Pentamer, m, Monomer; IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN; PLNwt, Wildtyp-PLN; PLN-I45A, PLN-Mutante, bei der das Isoleucin an Position 45 gegen Alanin ausgetauscht wurde; PLN-V49A, PLN-Mutante, bei der das Valin an Position 49 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Für alle folgenden Untersuchungen der Phosphorylierungsmuster von PLN-Monomeren und -Pentameren wurde für PLN mit ausgeprägter Pentamerbildung neben Wildtyp-PLN das PLN-I45A ausgewählt. Zur vergleichenden Analyse von PLN bei vollständig unterdrückter Oligomerbildung wurden AFA-PLN, bei dem die drei Cysteinreste der Transmembranregion mutiert sind, sowie PLN-L37A verwendet.

### 3.2 Sowohl PLN-Monomer als auch PLN-Pentamer stellen ein mögliches Zielprotein der PKA dar

Die Aktivität von PLN wird durch seine Phosphorylierungsstellen (Ser16/ Thr17) reguliert. Nach Phosphorylierung verliert PLN einen Teil seines inhibitorischen Effektes auf die SERCA2a, was eine verstärkte Aktivität der Kalzium-ATPase zur Folge hat (Kim *et al.*, 1990; Lohse *et al.*, 2003).

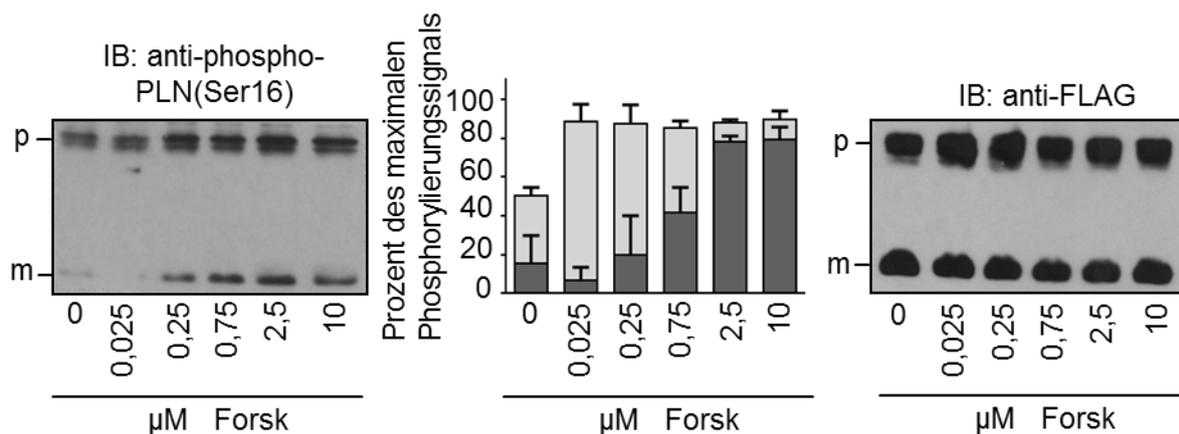
In diesem Versuchsansatz sollten die Phosphorylierungsmuster von PLN-Monomer und PLN-Pentamer vor und nach Stimulation der Protein-Kinase A (PKA) untersucht werden. Dabei wurde Forskolin verwendet, welches zur Stimulation der Adenylylcyclase (Daly, 1984) und somit zur Aktivierung der PKA und zur Phosphorylierung von PLN an Serin der Position 16 führt. Im Versuchsansatz sollte die Rolle der PLN-Pentamere im Regulations- bzw. Aktivitätsmechanismus näher betrachtet werden. Dem Pentamer war bislang keine aktive Rolle in der Regulation des Kalziumzyklus zugeteilt. Wichtig war nun zu ermitteln, wie sich sowohl Monomer als auch Pentamer unter Forskolin-Stimulation verhalten und ob nur das Monomer oder eventuell auch das Pentamer durch die PKA phosphoryliert werden kann. Auch war es wichtig das Verhalten der PLN-Monomere unter Anwesenheit oder Abwesenheit des PLN-Pentamers zu analysieren, wofür parallel zu Wildtyp-PLN die Stimulationsexperimente mit der ausschließlich Monomer-exprimierenden AFA-PLN-Mutante durchgeführt wurden.

Für die Untersuchung wurden mit Wildtyp-PLN transfizierte HEK293AD-Zellen verwendet. Das dabei transfizierte Wildtyp-PLN trug N-terminal die Aminosäuresequenz D-Y-K-D-D-D-D-K (FLAG-tag). Diese Erkennungssequenz diente der Detektion aller Mutanten im *Western blot*-Experiment mit gleicher Sensitivität (anti-FLAG-Antikörper). Nach Erwärmen von DPBS und DMEM-Medium (ohne weitere Zusätze) auf 37 °C im Wasserbad wurden die Zellkulturschalen 2x mit DPBS gewaschen und mit dem jeweiligen Stimulationsmedium bei

37 °C für 4 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 1x Lämmli-Puffer lysiert. Vier transfizierte Zellkulturschalen wurden mit unterschiedlichen Forskolin-Konzentrationen (0,025 µM/ 0,25 µM/ 0,75 µM/ 2,5 µM und 10 µM) stimuliert. Die verschiedenen Forskolin-Konzentrationen dienten zur Ermittlung einer Konzentration, bei der sowohl Pentamer als auch Monomer phosphoryliert vorlagen, die Phosphorylierung aber noch nicht maximal war. Da die Forskolin-Stammlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst wurde, war eine Kontrolle nötig, die ausschloss, dass DMSO allein Phosphorylierungsreaktionen auslösen kann. Hierfür wurde eine weitere Zellkulturschale in gleicher Weise wie die Forskolin-stimulierten Zellkulturschalen mit DMSO in DMEM stimuliert und anschließend mit 1x Lämmli-Puffer lysiert. Da PLN-Pentamere im 1 %igen SDS Gel nicht in Monomere dissoziieren (Kimura *et al.*, 1997), sondern als 25 kDa Bande detektiert werden, wurden im Versuch Monomere und Pentamere im *SDS-PAGE* getrennt und die Phosphorylierungsmuster über phosphospezifische Antikörper im *Western blot*-Experiment sichtbar gemacht. Ebenso wurde parallel als Kontrollexperiment die gesamte PLN-Menge aller Proben mit einer weiteren *Western blot*-Analyse unter Verwendung des anti-FLAG-Antikörpers detektiert. Die Signalintensitäten von Monomer und Pentamer vor und nach Phosphorylierung wurden über Quantifizierung durch *ImageJ software (Image processing and analysis in Java (ImageJ 1.45s); National Institute of Health, USA)* verglichen. Für jedes Experiment wurden verschieden stark belichtete Filme entwickelt wodurch der Sättigungsbereich der Banden ermittelt wurde. Zur Quantifizierung wurden gleich starke Belichtungsintensitäten der *Western blots* einbezogen und dabei keine gesättigten Banden gemessen und quantifiziert. Die relativen Bandenintensitäten, abzüglich des Hintergrundes, wurden relativ zur stärksten Bande (= 100 %) berechnet (siehe Ergebnisse Kapitel 3.3).

In den *Western blot*-Analysen von Wildtyp-PLN zeigte sich, dass die basale Phosphorylierung der PLN-Pentamere stärker war als die Phosphorylierung der PLN-Monomere (**Abb. 14**). Nach Stimulation der Zellen mit steigenden Forskolin-Konzentrationen

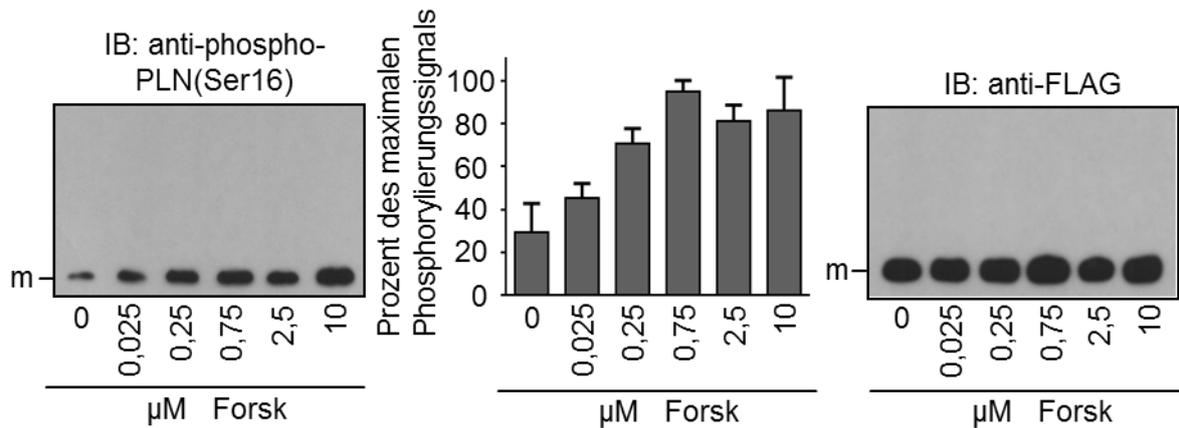
(0,025  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ ) über 4 min zeigten sowohl die Pentamere als auch die Monomere des Wildtyp-PLN steigende Intensitäten der Phosphorylierungssignale. Die PLN-Pentamere erreichten schon bei einer geringen Konzentration von 0,025  $\mu\text{M}$  Forskolin die maximale Phosphorylierung, wohingegen die vollständige Phosphorylierung der Monomere eine etwa 10-100-fach höhere Forskolin-Konzentration erforderte (**Abb. 14**). Kontrollexperimente zur Ermittlung der Gesamt-PLN-Menge mit anti-FLAG-Antikörpern bewiesen in allen Proben vergleichbare Mengen an PLN, die in den Versuchen ebenfalls ein stabiles Monomer-Pentamer-Verhältnis aufwiesen (**Abb. 14**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl Monomer als auch Pentamer von der PKA phosphoryliert werden und das PLN-Pentamer möglicherweise sogar die bevorzugte Zielstruktur darstellen könnte.



**Abb. 14: PLN-Pentamere wie auch -Monomere sind mögliche PKA-Substrate.**

Die Western Blot-Analyse von Wildtyp-PLN-transfizierten HEK293AD-Zellen zeigte eine starke basale Ser16-Phosphorylierung der PLN-Pentamere (obere Spuren links; hellgraue Säulen). Die Pentamer-Phosphorylierung stieg bei niedrigen Forskolin (Forsk)-Konzentrationen bis zum Erreichen der maximalen Phosphorylierung bei 0,25  $\mu\text{M}$  Forsk weiter an. Die maximale Monomer-Phosphorylierung hingegen (untere Spuren links; dunkelgraue Säulen) war erst bei einer 10 – 100x höheren Forskolin-Konzentration erreicht. Die gesamte PLN-Menge (rechts) wurde unter Verwendung von Antikörpern gegen den N-terminalen FLAG-tag der PLN-Konstrukte bestimmt (anti-FLAG). p, Pentamere; m, Monomere; anti-phospo PLN(Ser16), Antikörper gegen Ser16 phosphoryliertes PLN; Säulendiagramm zeigt Durchschnittswerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

Um die Fragestellung klären zu können, ob sich die Sensitivität der Monomer-Phosphorylierung in Abwesenheit von PLN-Pentameren ändert, wurden in einem weiteren Kontrollexperiment HEK293AD-Zellen mit der rein Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante transfiziert und mit steigenden Forskolin-Konzentrationen stimuliert. Im Gegensatz zu den Wildtyp-PLN-Monomeren zeigten die AFA-PLN-Monomere eine stärkere basale Phosphorylierung ohne vorangehende Stimulation (**Abb. 15**). Ebenfalls stieg die Phosphorylierung hier bei steigender Forskolin-Konzentration an. Eine maximale Phosphorylierung wurde in AFA-PLN-Monomeren jedoch bereits mit 0.75  $\mu$ M Forskolin erreicht, wohingegen diese Konzentration gerade einmal eine halbmaximale Phosphorylierung in den Monomeren des Wildtyp-PLNs herbeiführte (vgl. **Abb. 14** und **Abb. 15**). Dieser Befund deutete daraufhin, dass in Abwesenheit der Pentamere die Sensitivität der Monomer-Phosphorylierung höher ist.



**Abb. 15: Die Monomer-Phosphorylierung ist unter Abwesenheit des Pentamers verstärkt.**

Western blot-Analyse von AFA-PLN-transfizierter HEK293AD-Zellen demonstrierte eine veränderte Monomer-Phosphorylierung bei Abwesenheit von PLN-Pentameren. Im Vergleich zu Wildtyp-PLN-Monomeren (**Abb. 14**) waren die Phosphorylierungs-Signale sowohl basal als auch nach PKA-Stimulation stärker. Die gesamte PLN-Menge (rechts) wurde unter Verwendung von Antikörpern gegen den N-terminalen FLAG-tag der PLN-Konstrukte bestimmt (anti-FLAG) und blieb konstant stabil. p, Pentamere; m, Monomere; IB, *Immunoblot*; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Ser16 phosphoryliertes PLN; Säulendiagramm zeigt Durchschnittswerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten.

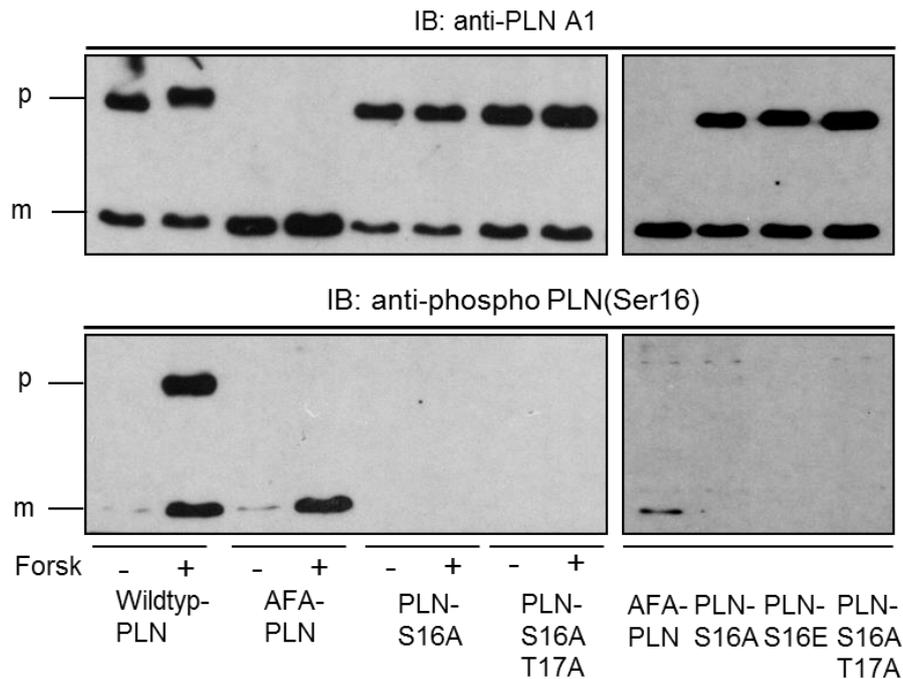
### 3.3 Bestimmung von Gesamt-PLN und phosphoryliertem PLN

Ein wichtiger Endpunkt dieser Arbeit war die Ermittlung des Anteils an phosphoryliertem PLN. Dazu müssen das Gesamt-PLN und das phosphorylierte PLN verlässlich bestimmt werden. Deshalb wurde die Spezifität der hier im *Western blot*-Verfahren verwendeten Antikörper getestet.

Es wurden die Spezifitäten der anti-PLN A1-Antikörper für die Bestimmung des Gesamt-PLNs sowie der anti-phospho-PLN(Ser16) (beide von der Firma Badrilla, GB) für die Bestimmung des phosphorylierten PLNs anhand transfizierter HEK293AD-Zellen untersucht. Die transfizierten Zellen wurden mit Forskolin (10 μM; 30 min) zur vollständigen PLN-Phosphorylierung stimuliert und anschließend lysiert sowie ohne Stimulation zur Analyse

verwendet. Im *SDS-PAGE* wurden die Proben getrennt und im *Western blot*-Experiment unter Verwendung der zu testenden Antikörper analysiert. Als Kontrollen dienten phosphodefiziente PLN-Mutanten, bei denen eine (PLN-S16A) oder beide (PLN-S16AT17A) Phosphorylierungsstellen degeneriert vorlagen. Zur weiteren Kontrolle wurde zusätzlich eine PLN-Mutante verwendet, die eine konstitutive Phosphorylierung simulierte (PLN-S16E).

Die mit Wildtyp-PLN oder AFA-PLN transfizierten HEK293AD-Lysate zeigten dabei, dass der phospho-spezifische Antikörper (anti-phospho-PLN(Ser16)) einen ausgeprägten Unterschied in den Signalintensitäten zwischen basaler PLN-Phosphorylierung und Forskolin-stimulierter PLN-Phosphorylierung erkennt (**Abb. 16**). Die parallel mit aufgetragenen phospho-defizienten PLN-Mutanten erkannte der anti-phospho-PLN(Ser16) nicht, da den Mutanten das Epitop zur Erkennung (Phosphorylierungsstellen) fehlt. Die Mutante, die eine konstitutive Phosphorylierung simulierte (PLN-S16E), wurde aufgrund der fehlenden Phosphat-Gruppierung im Protein und somit verändertem Epitop für den Antikörper ebenfalls nicht erkannt. Im parallel laufenden *Western blot*-Experiment zeigten alle Proben, phosphodefizient, konstitutiv phosphoryliert, mit Forskolin stimuliert oder basal phosphoryliert, unter Verwendung des anti-PLN A1-Antikörpers sowohl im PLN-Pentamer als auch im PLN-Monomer bei gleich aufgetragener Gesamtproteinmenge die gleiche Signalstärke. Somit konnte gezeigt werden, dass der anti-phospho-PLN(Ser16) ausschließlich phosphoryliertes PLN, der anti-PLN A1-Antikörper hingegen phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes PLN mit gleich hoher Affinität erkennt.



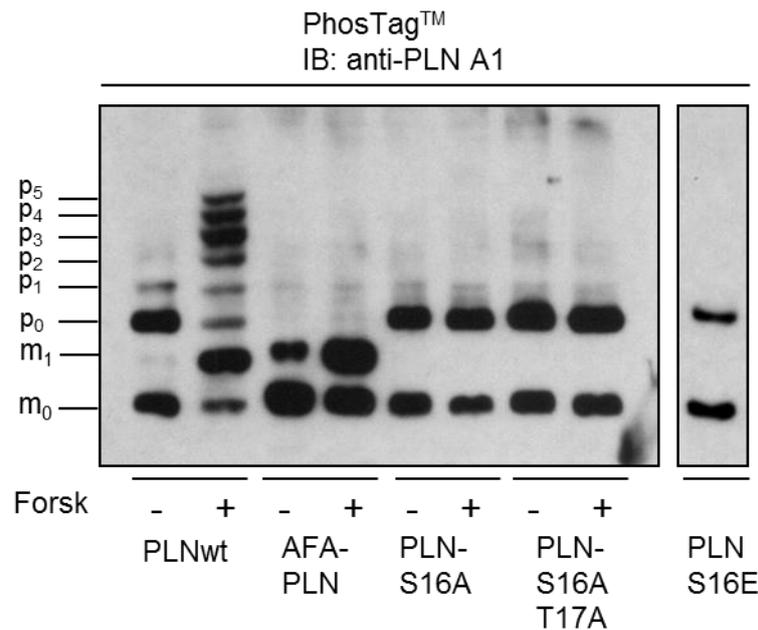
**Abb. 16: Im *Western blot*-Experiment mit transfizierten HEK293AD-Zellen zeigten die zu überprüfenden Antikörper ihre spezifischen Erkennungscharakteristika**

Transfizierte HEK293AD-Zellen wurden mit Forskolin (10  $\mu$ M; 30 min) zur PLN-Phosphorylierung stimuliert oder ohne Stimulation im *Western blot*-Experiment analysiert. Dabei zeigte sich im Wildtyp-PLN sowie im AFA-PLN, dass der anti-phospho-PLN(Ser16) nur das phosphorylierte PLN erkennen kann, hingegen der anti-PLN A1-Antikörper in allen Proben die gleiche Menge an PLN detektiert und somit die Gesamt-PLN Menge wiedergibt. Die phospho-defizienten Mutanten (PLN-S16A; PLN-S16AT17A) konnten auf Grund der fehlenden Phosphorylierungsstellen vom anti-phospho-PLN(Ser16) Antikörper nicht erkannt werden. Die eine konstitutive Phosphorylierung simulierende Mutante (PLN-S16E) konnte auch auf Grund der fehlenden Phosphat-Gruppe im Protein vom anti-phospho-PLN(Ser16) Antikörper ebenfalls nicht erkannt werden. p, Pentamer; m, Monomer; IB, *Immunoblot*; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen phosphoryliertes PLN; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN); Forsk, Forskolin.

Um die PLN-Phosphorylierung unabhängig vom phospho-spezifischen Antikörper nachzuweisen, wurde mit den gleichen Proben eine *PhosTag<sup>TM</sup>*-Analyse durchgeführt. Im *PhosTag<sup>TM</sup>*-Gel trennen sich die PLN-Proteine nicht nach Größe sondern nach Phosphorylierungszustand auf. *PhosTag<sup>TM</sup>* ist ein zweiwertiger Mangan-Komplex, der an Acrylamid des *SDS-PAGE*-Gels bindet und eine sehr hohe Affinität zu Phosphat-Gruppen in Proteinen besitzt. Im Gel bildet *PhosTag<sup>TM</sup>* mit phosphorylierten Proteinen Komplexe und

verlangsamt so ihr Wandern während der Elektrophorese. Diese Fixierung steigt mit zunehmender Zahl der Phosphatgruppen, so dass Proteine, die mehrere Phosphorylierungen tragen, sich im Gel langsamer bewegen können, als Proteine die weniger oder keine Phosphatreste tragen (siehe Material und Methoden Kapitel 3.5.1).

Um das Ergebnis des *Western blot*-Experiments (**Abb. 16**) zu validieren wurden die gleichen Proben wie in **Abb.11** verwendet. Der Phosphorylierungsunterschied zwischen basalem und Forskolin-stimuliertem Zell-Lysat zeigte sich im *PhosTag<sup>TM</sup>*-Gel in der steigenden Anzahl an Phosphorylierungsbanden im Wildtyp-PLN (**Abb. 17**). Im Pentamer waren dabei maximal sechs Banden zu erkennen. Die unterste Bande des Pentamers stellte das unphosphorylierte PLN ( $p_0$ ) dar. Die darüber liegenden Banden zeigten die nach und nach zunehmende Zahl an Serin16-Phosphorylierungen im Pentamer ( $p_1$ - $p_5$ ). In der ausschließlich Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante zeigte sich die Phosphorylierung im *PhosTag<sup>TM</sup>* in unterschiedlicher Bandenintensität zwischen basaler und stimulierter Probe. Basal war die unphosphorylierte Bande der Monomere ( $m_0$ ) stärker als die darüber liegende Bande der phosphorylierten Monomere ( $m_1$ ). Dieses Verhältnis drehte sich nach Forskolin-Stimulation um, sodass die Bande der phosphorylierten Monomere ( $m_1$ ) stark an Intensität zunahm. Die phospho-defizienten Mutanten (PLN-S16A; PLN-S16AT17A) sowie die PLN-Mutante, die eine konstitutive Phosphorylierung simuliert (PLN-S16E), erkannte das *PhosTag<sup>TM</sup>* aufgrund der fehlenden Phosphat-Gruppen nicht. Sie wanderten im Gel daher genau so schnell wie die entsprechenden unphosphorylierten Pentamere bzw. Monomere. Somit konnten im *PhosTag<sup>TM</sup>*-Gel unabhängig von phosphospezifischen Antikörpern die Unterschiede der basalen und der Forskolin-stimulierten PLN-Phosphorylierung bestätigt werden.



**Abb. 17: Die steigende Anzahl an Phosphorylierungsbanden nach Forskolin-Stimulation bestätigte phospho-Antikörper-unabhängig die verstärkte PLN-Phosphorylierung.**

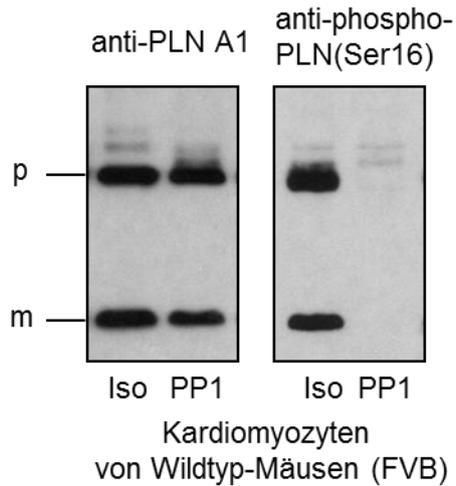
Transfizierte HEK293AD-Zellen wurden entweder mit Forskolin-Stimulation oder ohne PLN-Phosphorylierung für die anschließenden *PhosTag*<sup>TM</sup>-Experimente und *Western Blot*-Analysen verwendet. Bei diesen Experimenten trennte sich das Pentamer (p) wie auch das Monomer (m) nach der Menge an Phosphat-Gruppen im Pentamer (p<sub>1</sub>-p<sub>5</sub>) und Monomer (m<sub>1</sub>) auf. Dabei war im Wildtyp-PLN (PLNwt) sowie in der nur Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante (AFA-PLN) ein Anstieg des Banden-Musters nach Forskolin-Stimulation zu sehen. Die phospho-defizienten Mutanten (PLN-S16A; PLN-S16AT17A) konnten vom *PhosTag*<sup>TM</sup>-Zusatz auf Grund der zerstörten Phosphorylierungsstellen nicht erkannt werden. Auch die Mutante, die eine konstitutive Phosphorylierung simulierte (PLN-S16E) konnte auf Grund der fehlenden Phosphat-Gruppierung vom *PhosTag*<sup>TM</sup>-Zusatz nicht erkannt werden. Diese Mutanten wurden als eine, der basal unphosphorylierten (p<sub>0</sub>) entsprechenden Bande, aufgetrennt. IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1; Antikörper gegen das PLN-Protein (Gesamt-PLN); *PhosTag*<sup>TM</sup>, zweiwertiger Mangan-Komplex als Zusatz im Gel, welcher die Proteine nach Ihrer Phosphorylierungsstufe auftrennt.

In einem dritten Experiment wurden die Antikörper anstelle von HEK293AD-Zelllysaten mit Hilfe von Mausgewebe getestet. Kardiomyozyten von Mäusen wurden präpariert, auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und einmal mit PP1 (Proteinphosphatase1; 5 U/ ml; 10 min) dephosphoryliert und einmal mit Iso (Isoproterenol; 10<sup>-7</sup> M; 10 min) zur PKA-abhängigen PLN-Phosphorylierung stimuliert und anschließend im *Western blot*-Experiment mit den zu

untersuchenden Antikörpern analysiert. Dabei war das Ziel, die in HEK293AD-Zellen validierte Spezifität nochmals im Mausherzgewebe zu prüfen um eine Detektionslimitation, die durch zu geringe Expressionsmengen in HEK293AD-Zellen verursacht sein können, auszuschließen.

Die mit PP1 inkubierten Kardiomyozyten zeigten im *Western blot*-Versuch, unter Verwendung des anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörpers, sowohl im Pentamer wie auch im Monomer sehr schwache bis keine Signale (**Abb. 18**). Die mit Iso stimulierten Kardiomyozyten wiesen dabei ein deutlich stärkeres Signal im Pentamer und Monomer auf (**Abb. 18**). In der *Western blot*-Analyse der gleichen Proben mit anti-PLN A1-Antikörper konnte in allen Proben, ob mit PP1 dephosphoryliert oder mit Dobutamin phosphoryliert, die gleiche Banden-Intensität, sowohl im Pentamer wie auch im Monomer, gezeigt werden (**Abb. 18**). Somit konnte auch in diesem Experiment bestätigt werden, dass der anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörper nur phosphoryliertes PLN und der anti-PLN A1-Antikörper gleichermaßen phosphoryliertes und unphosphoryliertes PLN erkennt.

Zusammenfassend, in drei unabhängigen Experimenten, mit Kardiomyozyten, mit transfizierten HEK293AD-Zellen und im *PhosTag*<sup>TM</sup>-Gel konnte die Spezifität der hier verwendeten Antikörper anti-PLN A1 sowie anti-phospho-PLN(Ser16) nachgewiesen werden.



**Abb. 18: Testung der Antikörperspezifität in Maus-Kardiomyozyten mittels PP1 und Iso.**

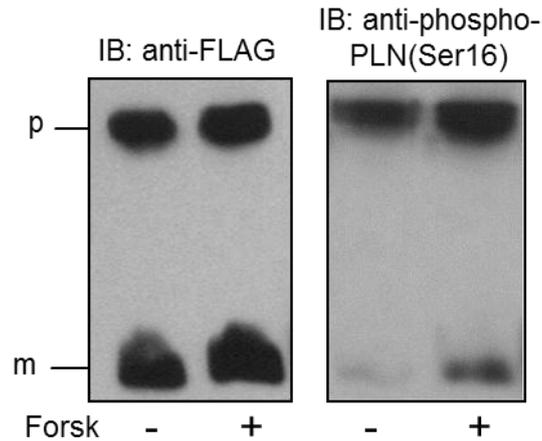
Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen (FVB) wurden präpariert und, aufgeteilt in zwei Reaktionsgefäßen, einmal mit PP1 (Proteinphosphatase1; 5 U/ ml; 10 min) zur PLN-Dephosphorylierung versetzt, einmal mit Iso (Isoproterenol;  $10^{-7}$  M; 10 min) zur PLN-Phosphorylierung stimuliert und anschließend im *Western blot*-Experiment analysiert. Dabei wurden gleiche Proteinmengen (15 µg) aufgetragen. Unter Verwendung der zu untersuchenden Antikörper (anti-phospho-PLN(Ser16) sowie anti-PLN A1) zeigte sich, dass nach Dephosphorylierung der phosphospezifische Antikörper (anti-phospho-PLN(Ser16)) das Protein nicht mehr erkennen kann, der anti-PLN A1-Antikörper hingegen, der das Gesamt-PLN erkennen soll, in allen Proben gleiche PLN-Mengen erkannte. p, Pentamer; m, Monomer; IB, Immunoblot; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN); anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serin16-phosphoryliertes PLN.

### 3.4 Die PKA-abhängige Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf das Gleichgewicht von PLN-Monomer und -Pentamer

Da in den PKA-Stimulationsversuchen gezeigt werden konnte, dass sowohl Monomer als auch Pentamer durch steigende Forskolin-Konzentrationen an Phosphorylierung zunahm, sollte im nächsten Schritt das Monomer-Pentamer-Verhältnis von PLN vor und nach Phosphorylierung näher betrachtet werden. In der Literatur wird angenommen, dass nach PKA-abhängiger Phosphorylierung PLN bevorzugt Pentamere bildet und sich somit das Gleichgewicht in Richtung Pentamerbildung verschiebt (Simmerman and Jones, 1998). Um dieser Aussage nachzugehen, wurden HEK293AD-Zellen mit Wildtyp-PLN transfiziert,

welches N-terminal die Erkennungssequenz trug (FLAG-tag). Anschließend wurden die transfizierten Zellen auf zwei kleine Zellkulturschalen gesplittet und einmal mit Forskolin zur PLN-Phosphorylierung stimuliert und einmal ohne Stimulation für die anschließende *Western blot*-Analyse verwendet. Die Proben wurden sowohl mit anti-FLAG-Antikörper wie auch mit anti-phospho-PLN(Ser16) untersucht. Anti-FLAG-Antikörper erkennt dabei das Gesamt-PLN, was hier der Untersuchung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses diente. Der anti-phospho-PLN(Ser16) erkennt nur die Phosphorylierung des Proteins, weshalb dieser Antikörper zur Prüfung der Forskolin-Stimulation diente.

*Western blot*-Analysen von transfizierten HEK293AD-Zellen zeigten deutlich gleichbleibende Pentamer-Monomer-Verhältnisse bei niedriger oder hoher Phosphorylierung des PLN-Proteins (**Abb. 19**). Die relative Menge an Gesamt-PLN (Monomere und Pentamere) blieb trotz einer überwiegenden Menge an phosphoryliertem Pentamer nach Stimulation der Zellen mit Forskolin stabil (**Abb. 19**).



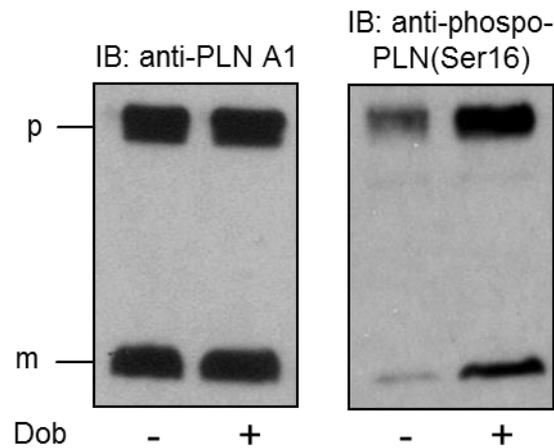
**Abb. 19: Unveränderte PLN-Monomer-Pentamer-Verteilung nach PKA-abhängiger Phosphorylierung in transfizierten HEK293AD-Zellen.**

*Western blot*-Experimente von HEK293AD-Zellen, die zuvor mit Wildtyp-PLN transfiziert wurden, welches N-terminal die FLAG-Erkennungssequenz trug, zeigten sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter ausgedehnter PLN-Phosphorylierung mit Forskolin (0,25  $\mu$ M; 120 min) vergleichbare Mengen von pentamerem (p) und monomerem (m) PLN. *Western blot*-Analyse mit anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörper bestätigte die gesteigerte PLN-Phosphorylierung nach Forskolin-Stimulation. IB, *Immunoblot*; Forsk, Forskolin; anti-FLAG, Antikörper gegen das N-terminale FLAG-Epitop von PLN; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serin 16-phosphoryliertes PLN.

In einem weiteren Schritt wurde der in transfizierten HEK293AD-Zellen durchgeführte Versuchsansatz in Mausherzen wiederholt. Hierbei wurde die PKA intravenös mit dem  $\beta$ -adrenergen Agonist Dobutamin (3,75  $\mu$ g/ min, 8 min) stimuliert und der Phosphorylierungszustand vor und nach Stimulation im *Western blot*-Experiment mit Hilfe des anti-phospho-PLN(Ser16) zur Detektion der PLN-Phosphorylierung sowie des anti-PLN A1-Antikörpers zur Detektion des Gesamt-PLN analysiert.

Die Stabilität des Monomer-Pentamer-Verhältnisses vor und nach Phosphorylierung in HEK293AD-Zellen konnte in Mausherzen bestätigt werden. Die zuvor mit Dobutamin infundierten Mäuse zeigten in *Western blot*-Analysen unter Verwendung des anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörpers eine stärkere PLN-Phosphorylierung als die Mäuse ohne Dobutamin (**Abb. 20**). Wiederum zeigte sich mit Hilfe des anti-PLN A1-Antikörpers in *Western blot*-

Experimenten das stabile, gleichbleibende Monomer-Pentamer Verhältnis vor und nach PLN-Phosphorylierung (**Abb. 20**).



**Abb. 20: Stabiles Pentamer-Monomer-Verhältnis in Dobutamin- vs. nicht-Dobutamin-stimulierten Mausherzen.**

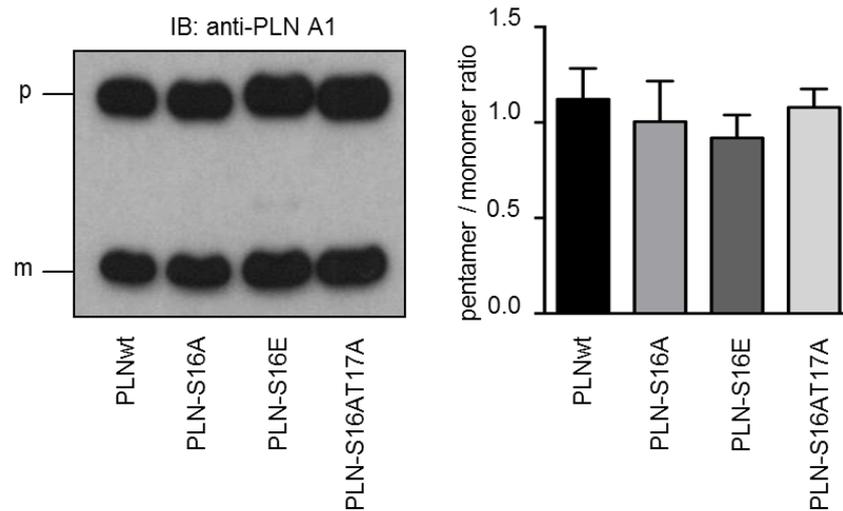
Mausherz-Lysate im analogen Experiment zu (**Abb. 19**) zeigten ebenfalls sowohl basal als auch unter intravenöser Infusion einer Hochdosis Dobutamin (3,75 µg/ min, 8 min) und damit verbundener PKA-abhängiger PLN-Phosphorylierung konstante Mengen an PLN-Pentamer (p) und Monomer (m). IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN); anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serin 16-phosphoryliertes PLN; Dob, Dobutamin.

Unabhängig von einer pharmakologischen PKA-Aktivierung und folgender PLN-Phosphorylierung wurden in einem dritten Versuchsansatz verschiedene PLN-Mutanten hinsichtlich ihres Monomer-Pentamer-Verhältnisses betrachtet. Diese besaßen entweder eine Mutation, die eine konstitutive Phosphorylierung simulierte (PLN-S16E) oder trugen eine Mutation die zur Degeneration einer (PLN-S16A) oder beider Phosphorylierungsstellen (PLN-S16A-T17A) führte (Hoshijima *et al.*, 2002).

*Western blot*-Experimente von transfizierten HEK293AD-Zell-Lysaten der drei Mutanten zeigten ein stabiles Verhältnis zwischen Monomer und Pentamer. Wie in **Abb. 21** zu sehen ist, lag das Pentamer-Monomer-Verhältnis der Mutanten ähnlich wie beim Verhältnis des Wildtyp-PLN zwischen 0.92 und 1.12 (SEM ± 0,15). In diesem Versuchsansatz, der an Stelle

der physiologischen PKA-Phosphorylierung mit phospho-defizienter (PLN-S16A; PLN-S16AT17A) bzw. phospho-mimetischer (PLN-S16E) PLN-Mutanten durchgeführt wurde, bestätigten sich die bisherigen Ergebnisse aus Wildtyp-PLN transfizierten HEK293AD-Zellen oder Wildtyp-Kardiomyozyten von Mäusen, dass das Pentamer-Monomer-Verhältnis vor und nach PLN-Phosphorylierung gleich ble

Es war somit unter keiner Bedingung eine Verschiebung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses durch Phosphorylierung, weder im Wildtyp-PLN, in Maus Herzen oder in PLN-Mutanten zu betrachten. Die Ergebnisse aller drei Versuchsansätze geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass das starke Phosphorylierungssignal der PLN-Pentamere nach Forskolin-Stimulierung nicht aus der Verschiebung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses herrührt sondern das PLN-Pentamer ein direktes und bevorzugtes Phosphorylierungssubstrat der PKA darstellt.



**Abb. 21: Gleichbleibende Monomer-Pentamer-Verteilung in PLN-Mutanten mit veränderten Phosphorylierungsmuster.**

Transfizierte HEK293AD-Zellen, die entweder Wildtyp-PLN (PLNwt) oder PLN-Mutanten, die eine konstitutive Serin16-Phosphorylierung simulierten (PLN-S16E) oder den Verlust einer (PLN-S16A) oder beider (PLN-S16A-T17A) Phosphorylierungsstellen aufwiesen, wurden im *Western blot*-Experiment analysiert. Alle Mutanten wiesen ein dem Wildtyp-PLN ähnliches Pentamer (p)-Monomer (m)-Verhältnis auf. IB, *Immunoblot*; PLN-S16A, PLN mit einer Serin gegen Alanin Substitution an Position 16; PLN-S16E, PLN mit einer Glutaminsäure-Substitution an Position 16; PLN-S16A-T17A, PLN mit Serin 16- und Threonin 17- Substitution gegen Alanin; anti-PLN A1, Antikörper gegen das PLN-Protein (Gesamt-PLN). Alle Experimente wurden mindestens 4mal durchgeführt mit einem SEM von 0,15

### 3.5 Die Pentamer-Phosphorylierung im PLN-Protein erfolgt stufenweise

Da in den vorangegangenen Experimenten das Pentamer als mögliches PKA-Target identifiziert wurde, sollte im nächsten Schritt das Ausmaß und die Stöchiometrie der PKA-abhängigen Phosphorylierung im PLN-Pentamer mit und ohne Forskolin-Stimulation näher betrachtet werden. Ziel war es herauszufinden in welchem Ausmaß und in welcher Reihenfolge die Komponenten der PLN-Pentamere durch die PKA phosphoryliert werden. Dazu wurden *PhosTag<sup>TM</sup>-SDS-PAGE*-Experimente mit anschließender *Western blot*-Analyse unter Verwendung des anti-PLN A1-Antikörpers, der das Gesamt-PLN erkennt, durchgeführt.

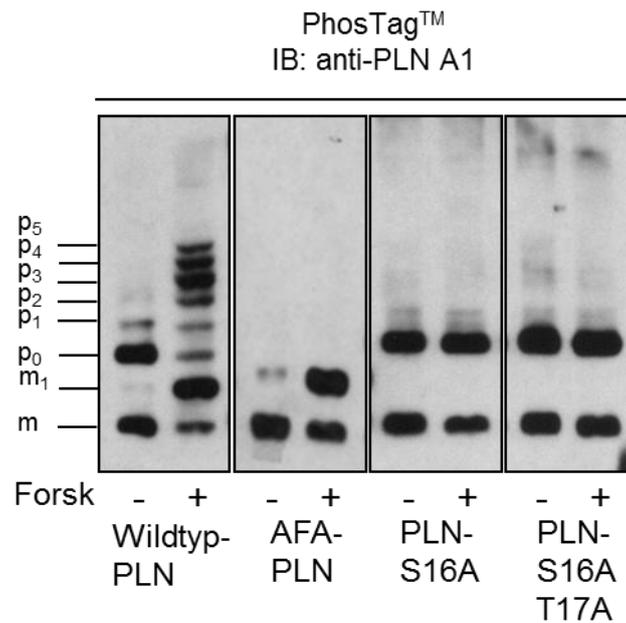
Die Auftrennung der PLN-Pentamere im *SDS-PAGE* mit Zusatz des Phosphat-bindenden Markers (*PhosTag<sup>TM</sup>*) führte zur Auftrennung des PLN-Pentamers entsprechend der Zahl der Phosphat-Gruppen. Mit dieser Auftrennungsmethode konnte somit untersucht werden, ob PLN-Pentamere bei der Phosphorylierung eine bestimmte Stöchiometrie favorisieren und ob alle fünf Protomere parallel phosphoryliert werden oder deren Phosphorylierung schrittweise abläuft.

HEK293AD-Zellen wurden mit Wildtyp-PLN transfiziert, welches N-terminal eine Erkennungssequenz (FLAG-tag) für die spätere Antikörper-Detektion im *Western blot*-Experiment trug. Die transfizierten Zellen wurden mit Forskolin stimuliert beziehungsweise zum Vergleich ohne Stimulation verwendet. Mit Hilfe des anti-PLN A1-Antikörpers, wurde die durch *PhosTag<sup>TM</sup>* aufgetrennte Phosphorylierung im *Western blot*-Experiment analysiert.

In den Experimenten mit anti-PLN A1-Antikörper konnte gezeigt werden, dass ohne Stimulation die Mehrzahl der Protomere des Wildtyp-PLN im unphosphorylierten Zustand vorliegen (**Abb. 22**). Die basale Phosphorylierung der Pentamere zeigte sich in maximal zwei phosphorylierten Protomeren im PLN-Pentamer (**Abb. 22**,  $p_0 - p_2$ ). Nach Stimulation mit Forskolin zeigte sich ein breites Phosphorylierungsmuster der Pentamere mit bis zu vier bis fünf phosphorylierten Protomeren (**Abb. 22**,  $p_0 - p_5$ ). Dabei lag die Mehrheit der PLN-Pentamere mit drei phosphorylierten Protomeren vor, was an der Stärke der Banden-Intensität zu erkennen war. Eine intensive Stimulation der PKA (2 Stunden.) schöpfte aber das Reservoir der unphosphorylierten Protomere im Pentamer (**Abb. 22**,  $p_0$ ) niemals ganz aus. Grob geschätzt blieben etwa 50 % der PLN-Pentamere zu jeder Zeit unphosphoryliert oder partiell (mit einem oder maximal zwei phosphorylierten Protomeren im Pentamer) phosphoryliert. Auch in Abwesenheit der Pentamere (rein Monomer exprimierende AFA-PLN-Mutante) war das PLN-Monomer basal schon teilweise phosphoryliert (**Abb. 22**,  $m_1$ ), lag aber zu etwa 80 % unphosphoryliert (**Abb. 22**,  $m_0$ ) vor. Nach starker Forskolin-

Stimulation (10  $\mu$ M; 30 min) nahm die Menge an phosphoryliertem Monomer zwar stark zu, aber etwa 40 des PLN-Monomers blieb auch nach dieser ausgeprägten  $\beta$ -adrenergen Stimulation unphosphoryliert (**Abb. 22**). Nur die phospho-defizienten Mutanten (PLN-S16A; PLN-S16AT17A) zeigten ein rein unphosphoryliertes Banden-Muster im *PhosTag*<sup>TM</sup>-Experiment, was dem Verlust der Phosphorylierungsstellen zuzuschreiben war und in diesen Versuchsansätzen als Kontrolle diente.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Pentamer-Phosphorylierung stufenweise erfolgt. Selbst eine starke Forskolin-Stimulation (2 Stunden) beziehungsweise PLN-Phosphorylierung konnte die Menge an unphosphorylierten Protomeren weder im Pentamer noch im Monomer (in Abwesenheit des Pentamers) nie ganz ausschöpfen.



**Abb. 22: Die Pentamer-Phosphorylierung erfolgt stufenweise.**

Western blot-Experimente mit 25  $\mu\text{M}$  PhosTag™ zeigten eine basale Phosphorylierung mit null ( $p_0$ ) bis einem Phosphat ( $p_1$ ) im PLN-Pentamer sowie eine maximale Phosphorylierung von fünf Stufen ( $p_0 - p_5$ ) nach 120 min PKA-Stimulation mit Forskolin (0,25  $\mu\text{M}$ ). p, Pentamer; m, Monomer; IB, Immunoblot;  $m_0/ p_0$ , unphosphoryliertes PLN;  $m_1/ p_1 - p_4$ , ein- bis mehrfach-phosphoryliertes PLN; PhosTag™, Phosphat-bindender Zusatz im SDS-Gel welcher Proteine nach Phosphorylierungsstatus trennt; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN); Forsk, Forskolin.

### 3.6 PLN-Pentamere verzögern die Phosphorylierung der PLN-Monomere

In der einschlägigen Literatur wurde dem Pentamer bislang keine wesentliche Funktion bei der PLN-Phosphorylierung und damit bei der Regulierung der SERCA2a-Aktivität zugeteilt. Vielmehr werden Pentamere als ein Speicher für phosphorylierte, und damit inaktive Monomere angesehen (Kranias and Hajjar, 2012).

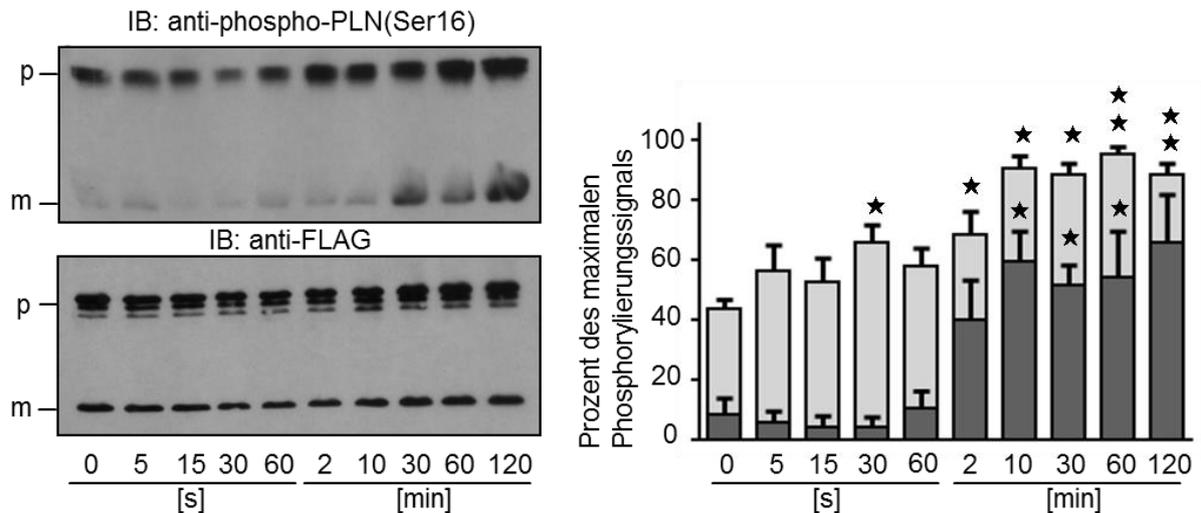
Da nun aber die ersten Phosphorylierungsexperimente gezeigt hatten, dass das PLN-Pentamer ein mögliches PKA-Target darstellt, die Phosphorylierung im Pentamer einen stufenweisen Verlauf zu haben scheint und die Phosphorylierung des PLN-Pentamers nach Stimulation mittels Forskolin stärker war als im PLN-Monomer, sollte nun im nächsten Schritt

der zeitliche Verlauf der PLN-Phosphorylierung im Pentamer und im Monomer untersucht werden. Der konzentrationsabhängige Forskolin-Stimulations-Versuch zeigte ferner, dass das Monomer in Abwesenheit des Pentamers (AFA-PLN) besser phosphoryliert wurde, weshalb im Vergleich zum Wildtyp-PLN parallel der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung der AFA-PLN-Mutante untersucht wurde.

Für die Experimente wurden HEK293AD-Zellen mit Wildtyp-PLN oder AFA-PLN transfiziert, die N-terminal eine Erkennungssequenz (FLAG-tag) trugen, die für die spätere Antikörper-Detektion im *Western blot*-Experiment von Bedeutung war. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen von zwei großen Zellkulturschalen (2 x 20 cm) auf 10 x 3 cm Zellkulturschalen verteilt, um durch Verwendung von Zellen aus der gleichen Transfektion in den Zellen aller Zellkulturschalen eine identische PLN-Expression zu gewährleisten. Die Zellen wurden mit einer geringen Konzentration Forskolin (0,25  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von maximal 120 min stimuliert. Dabei wurden die Zeitpunkte 0 s, 5 s, 15 s, 30 s, 60 s, 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min bis zum Abstoppen der Reaktion mit 1x Lämmli-Puffer gewählt, um das gesamte Zeitfenster abzubilden. Die Entscheidung, die geringe Dosis von 0,25  $\mu\text{M}$  Forskolin für den Kinetik-Versuch zu verwenden, resultierte aus den konzentrationsabhängigen Forskolin-Stimulationsversuchen. In dieser Versuchsreihe hatte die Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  eine deutliche, aber submaximale Phosphorylierung sowohl von PLN-Pentamer als auch von Monomer binnen 4 min gezeigt (**Abb. 14**). Damit ermöglichte diese Konzentration eine zeitliche Auflösung der PKA-abhängigen Phosphorylierung im Minuten- bis Stunden-Bereich. Die Phosphorylierungs-Intensitäten zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mittels *Western blot*-Experiment und anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörpern ermittelt. Als Kontrolle der gleichmäßigen PLN-Expression in allen Proben wurde ferner die Gesamt-PLN Menge mit Hilfe von anti-FLAG-Antikörper bestimmt. Wie in den konzentrationsabhängigen Forskolin-Stimulationsversuchen (siehe Ergebnisse Kapitel 3.2), wurden auch im Rahmen der *Western blot*-Analysen für die Kinetik-Experimente mehrere

Röntgen-Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten entwickelt. Zur Quantifizierung der Kinetik-Versuche wurden ausschließlich *Western blot*-Analysen in die quantitative Auswertung einbezogen, die (im Vergleich zu länger exponierten Filmen) keine Sättigung der Signale aufwiesen. Die prozentualen Bandenintensitäten von Monomer und Pentamer wurden, abzüglich des Hintergrundes, jeweils relativ zur stärksten Monomer- bzw. Pentamer-Bande (= 100 %) in dem betreffenden Versuch berechnet (siehe auch Ergebnisse Kapitel 3.3).

In Wildtyp-PLN exprimierenden HEK293AD-Zellen betrug die Bandenintensitäten und damit die Phosphorylierung der Pentamere basal (0 s) schon 40 % des Maximalwerts (**Abb. 23**). Innerhalb von 30 s Forskolin-Stimulation stieg die Phosphorylierung der Wildtyp-Pentamere signifikant auf 65 % der maximalen Phosphorylierung an. Über 120 min Stimulationszeit erreichte die Bandenintensität der Phosphorylierung etwa ~ 90 % der dunkelsten Bande (= 100 %). In den gleichen Versuchen des Wildtyp-PLN lagen die Wildtyp-Monomere ausgehend von der dunkelsten Bandenintensität (= 100 %) der maximalen Monomer-Phosphorylierung nur zu ~ 5 % basal phosphoryliert vor (0 s). Die Wildtyp-Monomere wiesen über die Stimulationszeit von 10 min einen signifikanten Anstieg auf 60 % der maximalen Phosphorylierung auf (**Abb. 23**).



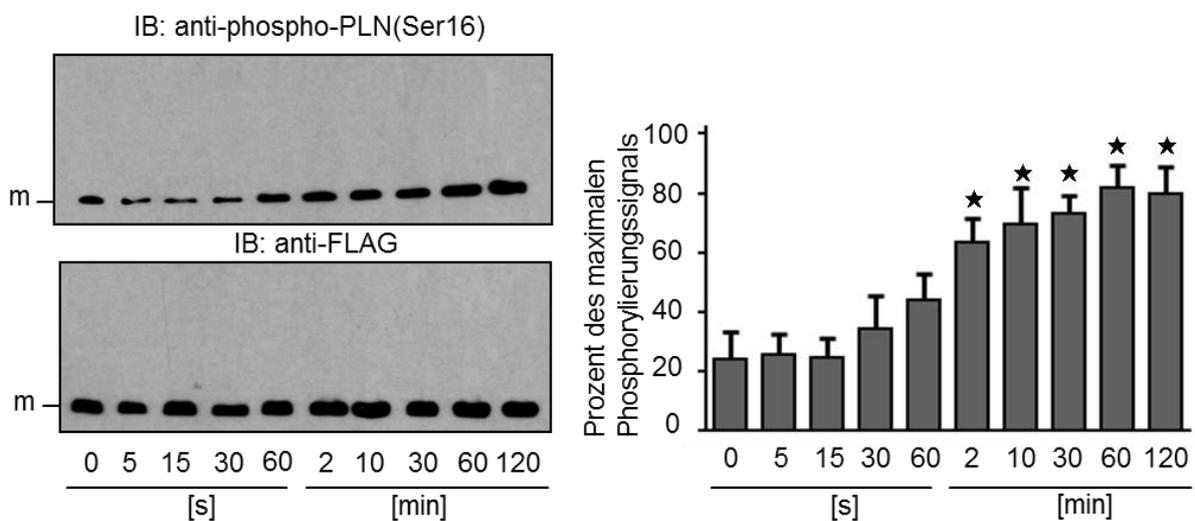
**Abb. 23: Kinetik der Phosphorylierung von Wildtyp-PLN-Mono- und -Pentameren.**

Die Kinetik der PKA-abhängigen PLN-Phosphorylierung in Wildtyp-PLN transfizierten HEK293AD-Zellen wurde mit Hilfe einer niedrig dosierten PKA-Stimulation (0,25  $\mu$ M Forskolin) über eine Zeitdauer von 5 s bis 120 min bestimmt. Die Kinetik wurde im *Western blot*-Experiment mit Hilfe von anti-phospho-PLN(Ser16)-Antikörper (links oben) oder mit Antikörpern, die die gesamte PLN-Menge durch Erkennung der N-terminalen FLAG-Aminosäuresequenz (FLAG-tag) von PLN erfassen (links unten) analysiert. Innerhalb eines Versuchsansatzes erfolgte die Quantifizierung der Kinetik über die relativen Bandenintensität von Monomer und Pentamer, die abzüglich des Hintergrundes, relativ zu ihrer stärksten Monomer- bzw. Pentamer-Bande (= 100 %) gesetzt wurden. Die PLN-Pentamere (hellgraue Säulen; rechts) des Wildtyp-PLNs zeigten eine starke basale Phosphorylierung von 40 % des Maximalwerts, die bei fortdauernder Stimulation signifikant weiter anstieg und eine Phosphorylierung von ~ 90 % des Maximalwerts innerhalb 120 min Stimulation erreichte. Die Wildtyp-Monomere (dunkle Säulen; rechts) wiesen dagegen basal eine geringere Phosphorylierung von ~ 5 % auf. Erst nach ca. 10 min Forskolin-Stimulation zeigten die Wildtyp-Monomere einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung auf rund 60 %. p, Pentamere; m, Monomere; IB, *Immunoblot*; s, Sekunden; min, Minuten; Säulendiagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 8 unabhängigen Experimenten. \*P < 0,05 vs. Basal-Phosphorylierung zum Zeitpunkt 0 (*one-way ANOVA*).

Auf einem etwas geringeren basalen Phosphorylierungs-Niveau startend, ähnelte die Kinetik der ausschließlich PLN-Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante (**Abb. 24**) stark der Kinetik der Wildtyp-PLN-Pentamere. Ausgehend vom maximal möglichen Phosphorylierungs-Signal (dunkelste Bandenintensität in einem Versuch (= 100 %)), war das Phospho-Monomer-Niveau von AFA-PLN bereits binnen 2 min signifikant auf etwa ~ 60 %

des Maximalwerts angestiegen und erreichte nach 120 minütiger Forskolin-Stimulation einen Phosphorylierungsgrad von etwa 80 % der maximalen Signalintensität.

In den kompletten Kinetik-Versuchsansätzen blieben die relativen Mengen von Pentamer und Monomer durchweg konstant (**Abb. 23** und **Abb. 24**). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung der Monomere durch Anwesenheit der Pentamere verzögert wird.



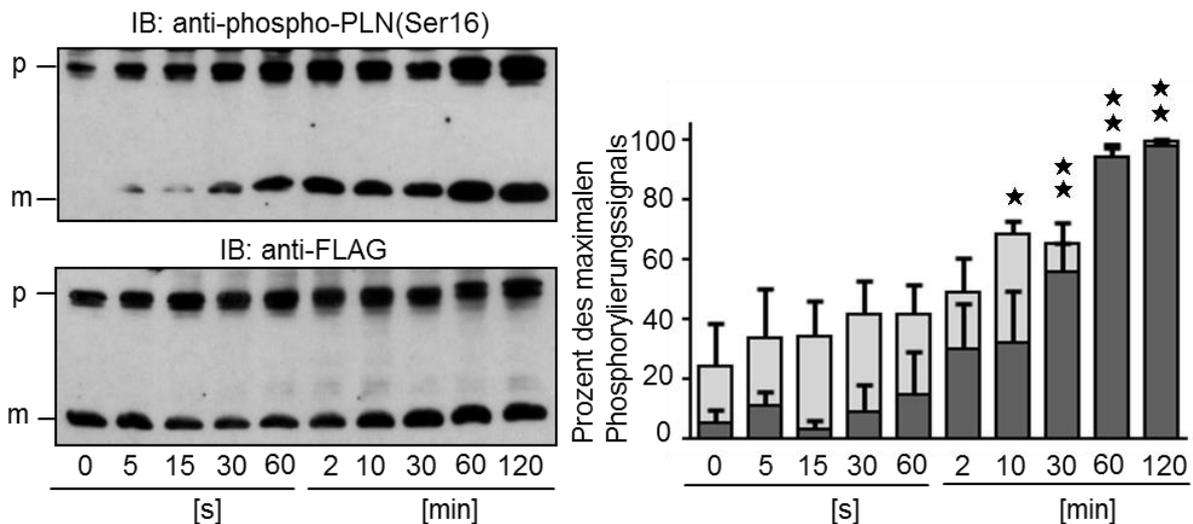
**Abb. 24: Bei der Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante verläuft die Kinetik der Phosphorylierung schneller.**

Im *Western blot*-Experiment der zeitabhängig (5 s - 120 min) Forskolin-stimulierten HEK293AD-Zell-Lysate zeigte die ausschließlich Monomer-exprimierende AFA-PLN-Mutante, dass die phosphorylierten Monomere schon basal (0 s) stärker phosphoryliert waren. Im weiteren Verlauf stieg die Monomer-Phosphorylierung bereits binnen 2 min Stimulation signifikant auf ~ 60 % des Maximalwerts an. Für jeden Versuchsansatz wurden die relativen Bandenintensitäten, abzüglich des Hintergrundes, relativ zur stärksten Bande (= 100 %) berechnet. m, Monomere; IB, *Immunoblot*; s, Sekunden; min, Minuten; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serin 16-phosphoryliertes PLN; anti-FLAG, Antikörper gegen die N-terminale Aminosäuresequenz (FLAG-tag); Säulendiagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 unabhängigen Experimenten. \* $P < 0,05$  vs. Basal-Phosphorylierung zum Zeitpunkt 0 (*one-way ANOVA*).

### 3.7 Unabhängige PLN-Mutanten bestätigen die Kinetik der Phosphorylierung von Wildtyp-PLN sowie AFA-PLN

Um die Phosphorylierungskinetik von Wildtyp-PLN zu überprüfen, wurde die zeitabhängige Phosphorylierung mit einer PLN-Mutante durchgeführt, die wie Wildtyp-PLN Pentamer bildet (PLN-I45A). Zur Bestätigung der Ergebnisse mit der AFA-PLN-Mutante wurde ebenso die Phosphorylierungskinetik der ausschließlich Monomer-exprimierenden Mutante PLN-L37A untersucht. Die PLN-L37A-Mutante diente außerdem der Überprüfung, ob ein Austausch der transmembranären Cysteine der AFA-PLN-Mutante die Phosphorylierung beeinflussen könnte (Kimura *et al.*, 1997).

PLN-I45A zeigte, wie Wildtyp-PLN, eine präferenzielle Phosphorylierung der PLN-Pentamere. Diese waren, bezogen auf die maximale Phosphorylierung (stärkste Bandenintensität innerhalb eines Versuchs (= 100 %), schon basal zu etwa ~ 25 % phosphoryliert. Die Phosphorylierungsintensität stieg über die Stimulations-Zeit von 120 min weiter an. Darüber hinaus zeigte die Pentamer-bildende Mutante wie Wildtyp-PLN eine verzögerte Zunahme der Monomer-Phosphorylierung. Erst nach etwa 30 min setzte die Phosphorylierung der Monomere signifikant ein. Somit zeigte die PLN-I45A ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie Wildtyp-PLN (**Abb. 25**).

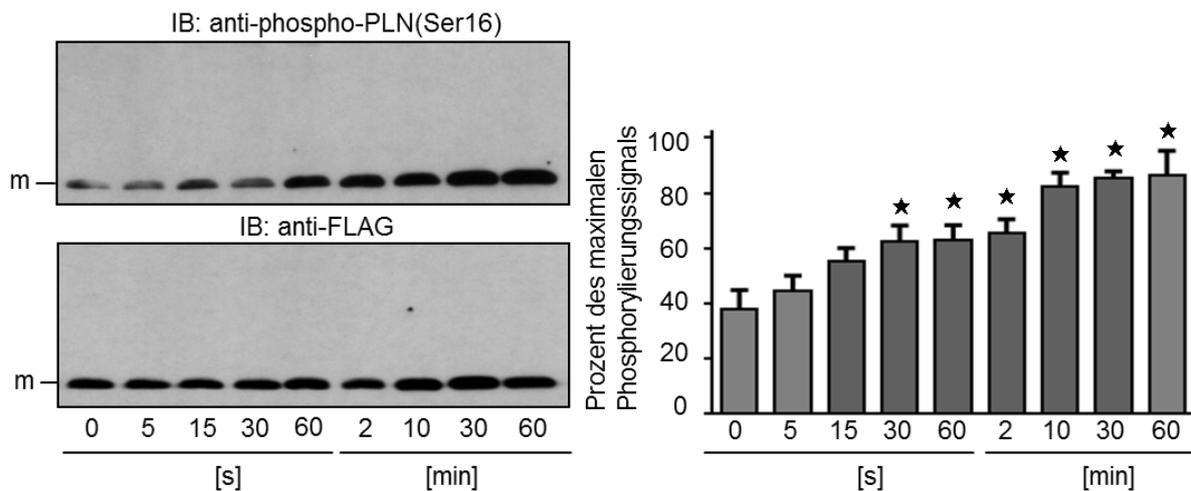


**Abb. 25: Phosphorylierungs-Kinetik der PLN-I45A-Mutante.**

Western blot-Experimente der Forskolin-Stimulations-Versuche (0,25  $\mu$ M Forskolin; 0 - 120 min Stimulationszeit) mit PLN-I45A zeigten mit Hilfe des anti-phospho-PLN(Ser16) Antikörpers den zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung von Monomer und Pentamer der Mutante. Die Phosphorylierung der Pentamere (hellgraue Säulen des Histogramms) der PLN-I45A-Mutante war basal stärker als die der Monomere und stieg im Verlauf weiter an mit signifikanten Werten ab 10 min Stimulationsdauer. Die phosphorylierten Monomere hingegen (dunkelgraue Säulen) waren in den ersten Minuten der Forskolin-Stimulation nur schwach zu detektieren und zeigten erst nach 30 min Stimulation einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierungssignale im Vergleich zum Ausgangswert. Für jeden Versuchsansatz wurden bei der Quantifizierung separat für Monomer und Pentamer die prozentualen Bandenintensitäten, abzüglich des Hintergrundes, relativ zur stärksten Bande (= 100 %) berechnet. p, Pentamere; m, Monomere; IB, Immunoblot; s, Sekunden; min, Minuten; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serine16-phosphoryliertes PLN; anti-FLAG, Antikörper gegen die N-terminale Aminosäuresequenz (FLAG-tag); Säulendiagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten. \*P < 0,05 vs. Basal-Phosphorylierung zum Zeitpunkt 0 (one-way ANOVA).

PLN-L37A stellt ebenso wie AFA-PLN eine ausschließlich PLN-Monomer produzierende Mutante dar, die aber, im Gegensatz zur AFA-Mutante, alle drei transmembranären Cysteinreste trägt. PLN-L37A zeigte im Western blot-Experiment die gleiche Phosphorylierungs-Kinetik wie die AFA-PLN-Mutante (vgl. **Abb. 24** und **Abb. 26**). Es war schon eine basal starke Phosphorylierung der PLN-L37A-Mutante zu detektieren (40 % der maximalen Phosphorylierung). Die Phosphorylierung stieg innerhalb von 30 s Stimulation

signifikant auf 60 % des Phosphorylierungs-Maximums an mit einem weiteren Anstieg im Verlauf. Somit war die für PLN-L37A beobachtete Phosphorylierungs-Kinetik ähnlich wie bei AFA-PLN. Ein möglicher Unterschied, bedingt durch Austausch der transmembranären Cysteine, konnte nicht gefunden werden, so dass ein Monomer-typisches Phosphorylierungsmuster beider Mutanten vermutet werden kann.



**Abb. 26: Phosphorylierungs-Kinetik der Monomer exprimierenden PLN-L37A-Mutante.**

Im *Western blot*-Versuch der Kinetik-Experimente (0,25  $\mu$ M Forskolin; 0 - 120 min Stimulationszeit) war in Abwesenheit der Pentamere (PLN-L37A-Mutante, die keine Pentamere bildet) eine basal starke Phosphorylierung der Monomere von 40 % des Maximalwerts gut zu erkennen. Die Phosphorylierung stieg über kurze Zeit (30 s) signifikant an und erreichte über 60 min Stimulationszeit eine Phosphorylierung von 80 % des Maximalwerts. Für jeden Versuchsansatz wurden die prozentualen Bandenintensitäten, abzüglich des Hintergrundes, relativ zur stärksten Bande (= 100 %) bestimmt und im Histogramm aufgetragen. m, Monomere; IB, *Immunoblot*; s, Sekunden; min, Minuten; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serine16-phosphoryliertes PLN; anti-FLAG, Antikörper gegen die N-terminale Aminosäuresequenz (FLAG-tag); Säulendiagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von 7 unabhängigen Experimenten. \*P < 0,05 vs. Basal-Phosphorylierung zum Zeitpunkt 0 (*one-way ANOVA*).

### 3.8 Die PKA hat eine verstärkte PLN-Affinität in Anwesenheit der PLN-Pentamere

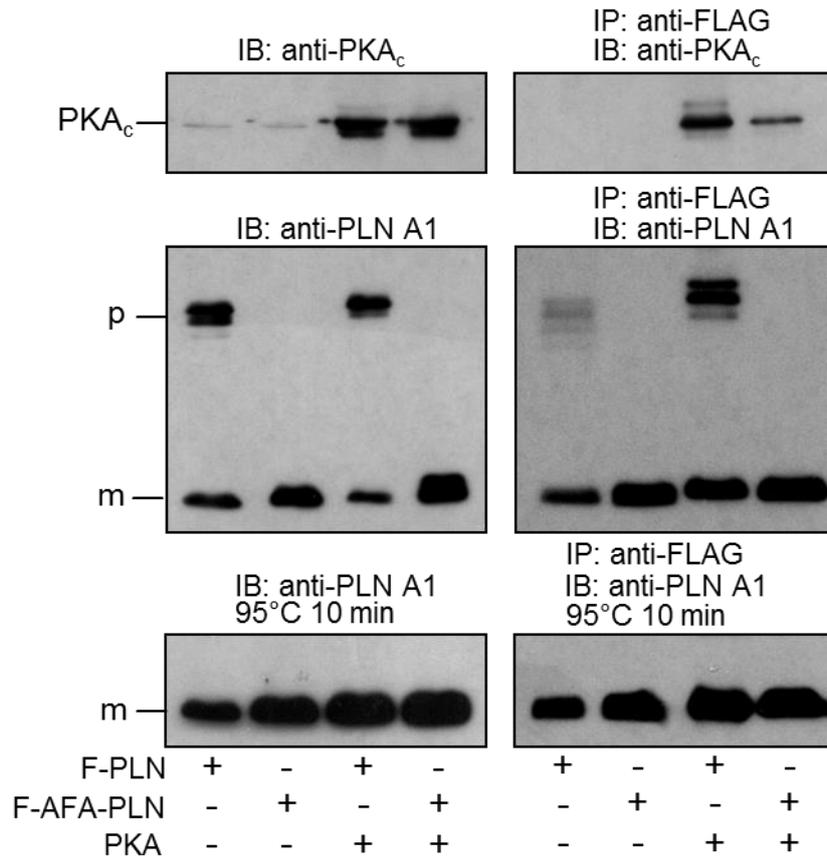
Wie die voran gegangenen Phosphorylierungsexperimente zeigten, war die PKA-abhängige Phosphorylierung der PLN-Pentamere stärker als die der PLN-Monomere (**Abb. 23 bis Abb. 26**). Waren sowohl Pentamere als auch Monomere in der gleichen Zelle anwesend (Wildtyp-PLN; PLN-I45A), so war die Phosphorylierung der Monomere deutlich reduziert. Diese Phosphorylierungsdominanz der Pentamere könnte durch eine Präferenz der PKA für das Pentamer als bevorzugtes Phosphorylierungssubstrat erklärt werden. Um dieser Vermutung nach zu gehen, wurden Co-Immunpräzipitationsversuche (Co-IPs) in HEK293AD-Zell-Lysaten durchgeführt. Dabei wurde die PKA entweder in Kombination mit Wildtyp-PLN, oder in Verbindung mit der AFA-PLN-Mutante, die beide N-terminal eine zusätzliche Aminosäuresequenz tragen (FLAG-tag), co-transfiziert. In den Co-IPs wurde mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers das PLN immunpräzipitiert und über *Western blot*-Experimente die am PLN anheftende PKA-Menge analysiert. Mit diesem Versuchsansatz sollte die Präferenz der PKA für eines der beiden PLN-Komponenten, Monomer oder Pentamer, als Substrat zur Phosphorylierung näher untersucht werden.

Zell-Lysate wurden von co-transfizierten HEK293AD-Zellen präpariert und Co-IPs mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers durchgeführt. Die für die Co-IPs verwendeten Zell-Lysate wurden parallel zu den Co-IPs im *SDS-PAGE* sowie im folgenden *Western blot*-Experiment aufgetragen, um die Expression vor und nach der Co-IP zu kontrollieren und das Mengen-Verhältnis von Wildtyp-PLN und AFA-PLN zu prüfen. Zur weiteren Kontrolle wurden die Zell-Lysate und Co-IPs zusätzlich bei 95 °C 10 min gekocht, so dass das Pentamer im Wildtyp-PLN vollständig dissoziierte und die Verhältnisse zwischen Wildtyp-PLN und AFA-PLN im *Western blot*-Experiment anhand der Monomer-Menge besser verglichen werden konnten. Die Experimente wurden unter Verwendung des anti-PKA<sub>c</sub> Antikörpers, der zur Detektion der katalytischen Untereinheit (c) der PKA diente, sowie unter Gebrauch des anti-PLN A1-

Antikörpers, der das PLN-Protein detektierte, quantifiziert (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.11).

Die *Western blot*-Analysen der Co-IPs zeigten deutlich stärkere Signale der katalytischen Untereinheit der PKA im Präzipitat von Wildtyp-PLN im Vergleich zur rein Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante. Die Kontrollen zur Prüfung der Proteinexpression von Wildtyp-PLN und AFA-PLN zeigten sowohl im Zell-Lysat, in der Co-IP und in den gekochten Proben sehr ähnliche Mengen von Wildtyp-PLN und AFA-PLN. Auch die Expression der PKA in den Lysaten war in allen Co-Transfektionen vergleichbar (**Abb. 27**).

Die co-immunpräzipitierte PKA-Menge war für Wildtyp-PLN höher als bei der AFA-Mutante (**Abb. 27**). Somit scheint die Affinität der PKA für Wildtyp-PLN höher, als für die rein Monomer-exprimierenden AFA-PLN-Mutante, möglicherweise auf Grund der Anwesenheit der Pentamere im Wildtyp-PLN.



**Abb. 27: Die PKA hat eine hohe Affinität zu Wildtyp-PLN.**

Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) von HEK293AD-Zellen mit Wildtyp-PLN oder AFA-PLN, die N-terminal eine Erkennungssequenz (FLAG-*tag*) trugen und jeweils in Kombination mit der PKA transfiziert waren, zeigten im anschließenden *Immunoblot*-Experiment eine höhere Menge an PKA in Wildtyp-PLN im Vergleich zur rein Monomer exprimierenden AFA-PLN-Mutante. *Western blot*-Experimente der für die Co-IP verwendeten Zell-Lysate sowie der gleichen, aber gekochten Proben (95 °C 10 min), mit anti-PKA<sub>c</sub>- und anti-PLN A1-Antikörper dienten als Kontrolle der Expression. Die schwachen PKA-Signale, die in untransfizierten HEK293AD-Zellen zu detektieren waren, zeigten die endogene PKA-Expression. p, Pentamer; m, Monomer; IP, Immunpräzipitation; IB, *Immunoblot*; anti-PKA<sub>c</sub>, Antikörper, der die katalytische Untereinheit der PKA erkennt; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN).

### 3.9 PLN-Pentamer und -Monomer binden an die Kalzium-ATPase SERCA2a

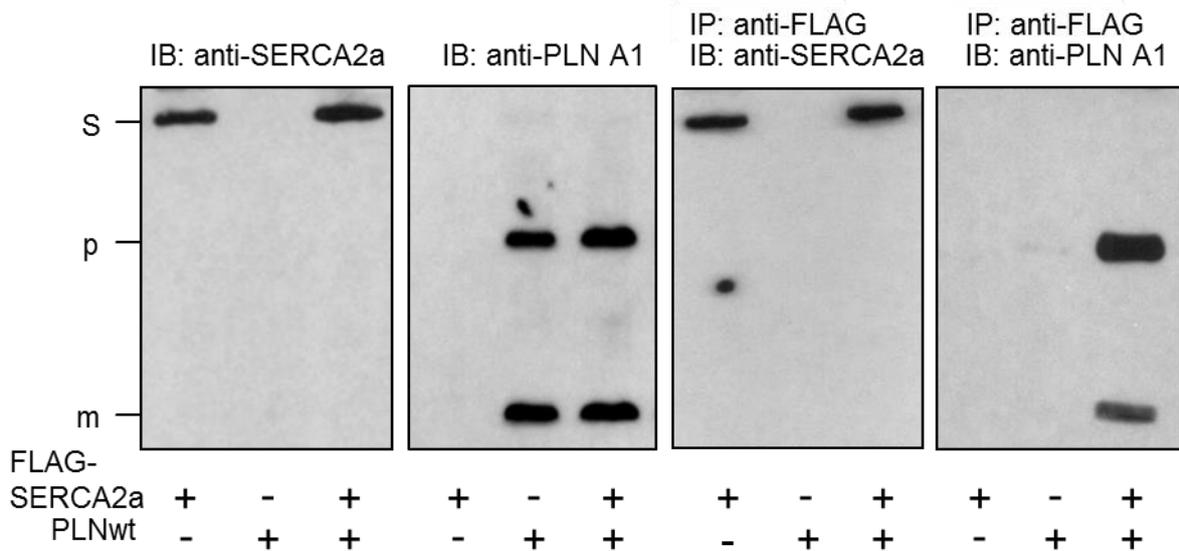
Molekulare Strukturanalysen ergaben ein Modell, welches zeigt, dass das PLN-Monomer nahe der beiden Kalziumbindestellen, die zwischen den Helices M2/ M4/ M6 und M9 angesiedelt sind, bindet. Dabei antagonisiert PLN die Kalzium-Bindung an die SERCA2a, wobei die Funktionsfähigkeit des PLN-Moleküls, d.h. die Fähigkeit durch die PKA phosphoryliert zu werden, erhalten bleibt (Toyoshima *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2008). Ob und wie PLN-Pentamere an die SERCA2a binden können ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Neueste Studien zeigten, dass das PLN-Pentamer an einer weiteren, zusätzlichen Region der M3-Helix der SERCA2a binden kann (Chen *et al.*, 2003; Glaves *et al.*, 2011).

Da die durchgeführten Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass das PLN-Pentamer möglicherweise das bevorzugte Substrat der PKA-Phosphorylierung darstellt (**Abb. 27**), sollte nun im nächsten Schritt die Frage geklärt werden, ob das PLN-Pentamer in der Regulation der Kalziumpumpe eine weitere wichtige Rolle einnehmen kann. Wichtig war hierbei die Untersuchung der Affinität von PLN-Pentameren und Monomeren zur SERCA2a, um mögliche Interaktionsunterschiede zwischen SERCA2a und Monomer sowie zwischen SERCA2a und Pentamer aufzudecken. Außerdem sollten diese Experimente klären, ob die PLN-Pentamere nahe der SERCA2a lokalisieren. Die Aktivität der Kalzium-ATPase hängt unmittelbar vom Phosphorylierungszustand der PLN-Monomere ab. Daher erscheint eine Co-Lokalisation von Pentamer, Monomer und SERCA2a eine Voraussetzung für potentielle Auswirkungen der beobachteten Reduktion der Monomer-Phosphorylierung durch die Pentamere auf die SERCA2a-Aktivität darzustellen.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden mit transfizierten HEK293AD-Lysaten Co-Immunpräzipitationsversuche (Co-IPs) durchgeführt. Dabei wurde SERCA2a, die N-terminal

eine FLAG-Aminosäuresequenz trug (FLAG-SERCA2a), mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers präzipitiert und die PLN-Bindungspartner (Monomer und/ oder Pentamer) analysiert. Alle Proben wurden unter Verwendung von anti-PLN A1-Antikörper und anti-FLAG-Antikörper beziehungsweise anti-SERCA2a Antikörper im *Western blot*-Experiment analysiert.

Sowohl Pentamer als auch Monomer wurden aus HEK293AD-Lysaten mit SERCA2a co-immunpräzipitiert (**Abb. 28**). Der Vergleich der Pentamer- und Monomer-Mengen, die immunpräzipitiert wurden, zeigten, dass sogar tendenziell mehr PLN-Pentamer als Monomer in den Präzipitaten enthalten war. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl Monomer als auch Pentamer mit der SERCA2a interagieren können und dass möglicherweise Pentamere eine höhere Affinität zur SERCA2a haben als PLN-Monomere.



**Abb. 28: PLN-Pentamere binden verstärkt an die Kalzium-ATPase SERCA2a.**

Western blot-Experimente der Co-Immunpräzitationsversuche (Co-IP) von SERCA2a und Wildtyp-PLN (PLNwt) aus transfizierten HEK293AD Zellen zeigten eine Interaktion zwischen SERCA2a und PLN. Sowohl PLN-Pentamer als auch Monomer binden an die SERCA2a, jedoch zeigten die PLN-Pentamere eine tendenziell stärkere Bindung im Vergleich zu den PLN-Monomeren. S, SERCA2a; p, Pentamer; m, Monomer; IP, Immunpräzitation; IB, *Immunoblot*; anti-SERCA2a, Antikörper gegen das Protein SERCA2a; anti-PLN A1, Antikörper gegen das PLN-Protein. Es wurden 4 Experimente mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

Um die SERCA2a-PLN-Interaktion in physiologischem Umfeld betrachten zu können, wurden die Co-IP Experimente nicht nur mit transfizierten HEK293AD-Zellen (**Abb. 28**), sondern auch mit Mäuseherzen durchgeführt. Dadurch sollten zugleich die Ergebnisse aus HEK293AD-Zellen auf mögliche Unterschiede aufgrund der Überexpression der Proteine in den transfizierten HEK293AD-Zellen kontrolliert werden. Für diesen Versuchsansatz wurden aus Wildtyp-Mäusen (FVB) Rohmembranen präpariert (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.8.3) und anschließend mit Hilfe des anti-SERCA2a-Antikörpers präzipitiert. Die Co-IPs sowie die für die Co-IP verwendeten Rohmembranen wurden mittels *SDS-PAGE* und anschließendem *Western blot*-Experiment unter Verwendung von anti-PLN A1-Antikörpern zur Ermittlung der SERCA2a-Interaktionspartner (Monomer und Pentamer) sowie mit anti-SERCA2a als Kontrolle analysiert.

Die Co-IP mit Herz-Rohmembranen bestätigte das Ergebnis der Co-IP aus HEK293AD-Zellen. Auch aus den Herzen, die eine physiologische Verteilung von SERCA2a und PLN hatten, wurde verstärkt PLN-Pentamer mit der Kalzium-ATPase SERCA2a immunpräzipitiert (**Abb. 29**)

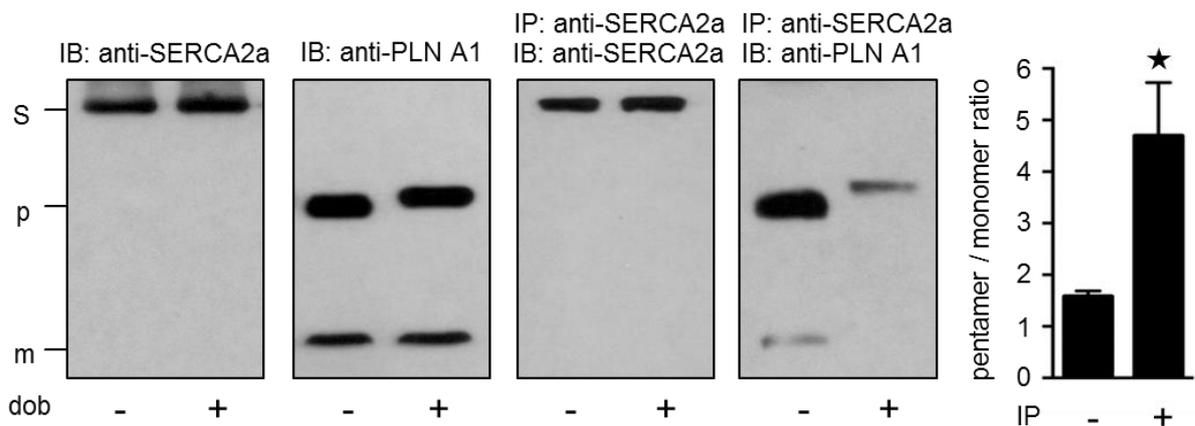
Im nächsten Schritt wurde in Rohmembranen von Mausherzen die SERCA2a-PLN-Interaktion vor und nach PLN-Phosphorylierung untersucht. Dabei sollten mögliche Interaktionsunterschiede zwischen SERCA2a-Monomer oder SERCA2a-Pentamer näher betrachtet werden. Bisläng wurden zwei Mechanismen der Interaktion zwischen PLN und SERCA2a postuliert. Die Interaktion der PLN-Proteine wurde über eine kontinuierliche Bindung zwischen PLN und SERCA2a beschrieben, wobei nur durch Konformationsänderungen der Proteine (durch PLN-Phosphorylierung ausgelöst) die Inhibition der SERCA2a gesteuert wurde (Bidwell *et al.*, 2011; Gruber *et al.*, 2012; James *et al.*, 2012). Als weiterer Mechanismus wurde eine Diffusions-gesteuerte Interaktion postuliert, bei welcher das PLN durch Diffusion die Aktivität der SERCA2a steuert (Morita *et al.*, 2008; Akin *et al.*, 2010).

In einem entsprechenden Versuchsansatz sollte nun die Interaktion der beiden PLN-Formationen (Monomer und Pentamer) unter Beachtung der beiden möglichen Interaktions-Mechanismen untersucht werden.

Für diese Versuche wurden die Herzen der unstimulierten Wildtyp-Mäuse (FVB) in Ruhe, d.h. nach 20 min Narkose auf der Wärmeplatte, entnommen. Die zweite Gruppe Mäuse (FVB) wurde ebenfalls sediert, aber vor Entnahme der Herzen mit Dobutamin (3.75  $\mu\text{M}$ / ml) zur PLN-Phosphorylierung stimuliert. Aus diesen Herzen wurden anschließend Rohmembranen präpariert und diese für Co-IP-Experimente verwendet (Az. 54-2531.01-20/10). In den Co-IP-Experimenten wurde die SERCA2a mit Hilfe des anti-SERCA2a Antikörpers immunpräzipitiert und im anschließenden *Western blot*-Experiment mit anti-PLN

A1-Antikörper, die mit der SERCA2a interagierenden PLN-Komponenten analysiert. Der anti-SERCA2a Antikörper diente dabei der Kontrolle.

Die Experimente der stimulierten und unstimulierten Rohmembranen zeigten, dass die Stimulation mit Dobutamin und damit die PLN-Phosphorylierung die Co-Immünpräzipitation von PLN-Pentameren vermindert und die der PLN-Monomere verhindert (**Abb. 29**).

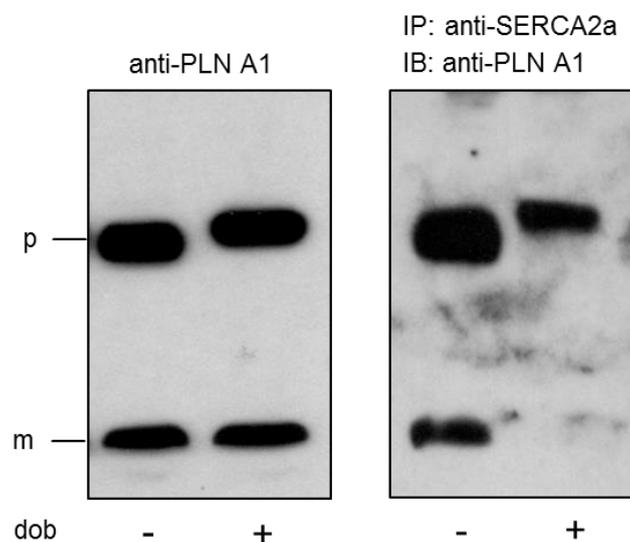


**Abb. 29: Verminderte SERCA2a-Pentamer-Bindung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation**

*Western blot*-Experimente zeigten die Co-Immünpräzipitation (Co-IPs) unter Verwendung von Mauserz-Rohmembranen, die zuvor mit oder ohne Dobutamin (dob) stimuliert wurden. Nach Dobutamin-Stimulation reduzierte sich die PLN-Pentamer-Bindung an die SERCA2a. Die SERCA2a-Monomer-Bindung hingegen wurde nach Dobutamin-Stimulation vollständig aufgehoben, was auf eine mögliche Dissoziation der Monomere von der SERCA2a nach PKA-abhängiger Phosphorylierung hinwies. Der Vergleich der PLN-Signale vor und nach *Co-IP* zeigte eine stärkere SERCA2a-Bindung an PLN-Pentamere als an Monomere. Das Histogramm gibt den Mittelwert des Pentamer zu Monomer Verhältnisses vor (-IP) und nach (+IP) Immünpräzipitation von 4 Mäusen pro Gruppe (\* $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ) an. S, SERCA2a; p, Pentamer; m, Monomer; dob, Dobutamin; IP, Immünpräzipitation; IB, *Immunoblot*; anti-SERCA2a, Antikörper gegen das Protein SERCA2a; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN).

Auch nach längerer Belichtung der *Western blot*-Membran konnte kein PLN-Monomer in den Proben der Co-IP-Experimente detektiert werden (**Abb. 30**). Dies deutete darauf hin, dass die Monomere nach Phosphorylierung vollständig von der SERCA2a dissoziieren. Dobutamin-Stimulation verminderte ebenso die Assoziation von PLN-Pentameren und

SERCA2a. Anscheinend reduzierte die PLN-Phosphorylierung die Affinität der SERCA2a sowohl für die Monomer- als auch für die Pentamer-Bindung. Ein signifikanter Anteil der PLN-Pentamere blieb jedoch im Gegensatz zu den Monomeren trotz Stimulation mit Dobutamin an die SERCA2a gebunden. Da auch nach intensiver Stimulation die Phosphorylierung der Pentamere unvollständig war (Ergebnisse Kapitel 3.5; Abb. 25), könnten unphosphorylierte Pentamer-Protomere einen möglichen Grund für die erhaltene SERCA2a-Bindung darstellen.

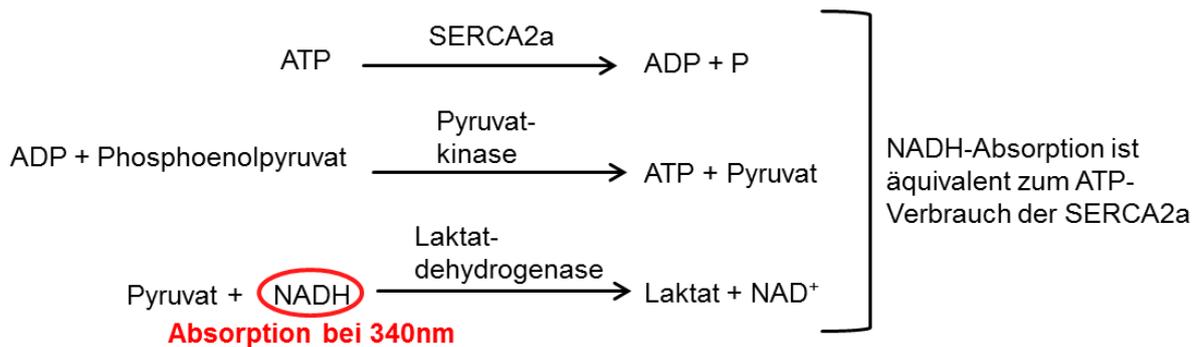


**Abb. 30: Dobutamin-Stimulation von Mausherzen löste die SERCA2a-Monomer-Bindung vollständig auf.**

Co-Immunpräzipitations (Co-IP)-Experimente von PLN-Monomeren und Pentameren mit SERCA2a in Mausherz-Rohmembranen, die entweder ruhend (nach 20 min Sedierung) oder nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation (Dobutamin; 3,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) entnommen wurden zeigten im *Immunoblot* (IB) auch nach einer Langzeit-Exposition auf Röntgenfilm keine PLN-Monomere in der zuvor mit Dobutamin stimulierten Maus. Dies deutete darauf hin, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation die SERCA2a-Monomer-Bindung vollständig aufgehoben hat, wohingegen eine geringe Menge an PLN-Pentameren weiterhin mit der SERCA2a interagieren konnte. p, Pentamere; m, Monomere; dob, Dobutamin; IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN).

### 3.10 Das enzymgekoppelte, NADH-abhängige SERCA2a-Aktivitätsexperiment

In den Co-IP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl Pentamer als auch Monomer an die SERCA2a binden, diese Interaktion durch PLN-Phosphorylierung im Monomer vollständig aufgehoben werden kann, das Pentamer dabei aber partiell an die SERCA2a gebunden bleibt (**Abb. 29; Abb. 30**). Im nächsten Schritt sollte aus diesen Gründen die Inhibition der Kalzium-ATPase durch Pentamer und Monomer verglichen werden, um zu untersuchen, ob sich die in den Co-IP detektierten Interaktions-Unterschiede auch in einer veränderten SERCA2a-Aktivität widerspiegeln. Für diese Fragestellung wurde die SERCA2a-Enzymaktivität über einen enzymgekoppelten *NADH* (Nicotinamidadenindinucleotid)-abhängigen Reaktionsablauf gemessen. Dieser Versuchsaufbau wurde von Münch et al. an humanem Herzgewebe etabliert (Münch *et al.*, 2002) und für diese Versuchsreihe auf Rohmembranen von Maus Herzen verifiziert. Diesem Experiment liegt ein Reaktionsablauf zu Grunde, bei dem der ATP (Adenosintri-phosphat)-Verbrauch der SERCA2a gemessen wurde. In diesem Mechanismus wurde das dabei entstandene ADP durch die Pyruvatkinase (PK) und mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat (PEP) wieder zu ATP umgewandelt. Dabei entstand Pyruvat, welches anschließend von der Laktatdehydrogenase (LDH) unter Oxidation von NADH zu Laktat und NAD<sup>+</sup> umgesetzt wurde (**Abb. 31**). Der NADH-Verbrauch war hierbei äquivalent zum ATP-Verbrauch der SERCA2a. (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.10).



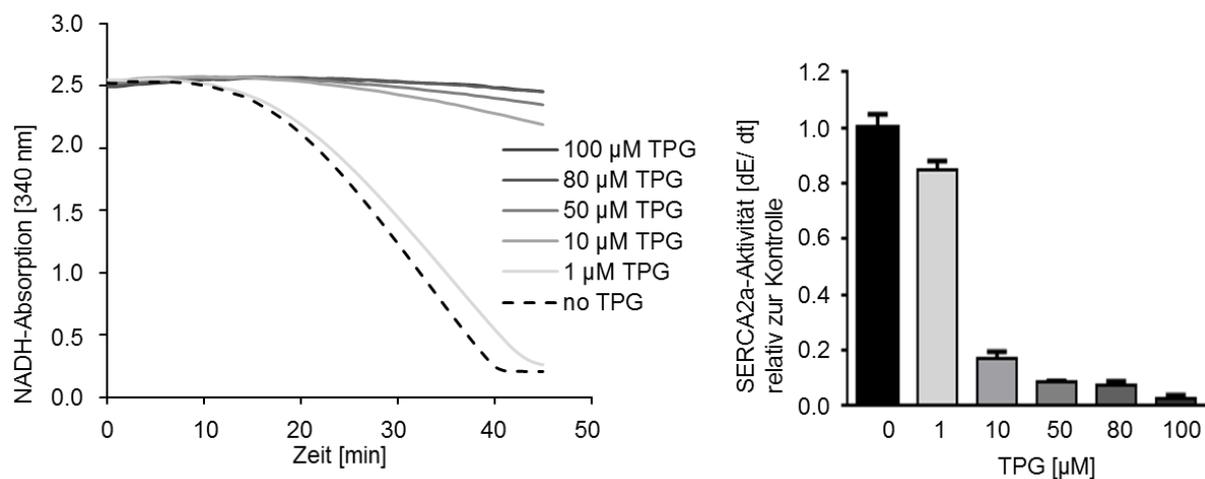
**Abb. 31: Reaktionsablauf des enzymgekoppelten, NADH-abhängigen SERCA2a-Aktivitäts-Experiments.**

Die Messung erfolgte durch photometrische Bestimmung des NADH-Verbrauches bei 340 nm, der durch die dargestellte Reaktion verursacht wurde. ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; P, freies Phosphat; NADH, Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form);  $\text{NAD}^+$ , Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form).

Um sicherzugehen, dass in den enzymgekoppelten NADH-abhängigen SERCA2a-Aktivitätsexperimenten ausschließlich die Aktivität der Kalzium-ATPase SERCA2a gemessen wurde, sollte im ersten Schritt die Spezifität des Versuches ermittelt werden. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass der SERCA2a-abhängige NADH-Verbrauch nicht durch den NADH-Umsatz anderer ATPasen verfälscht wurde.

Die Spezifität des SERCA2a-Experiments wurde im ersten Schritt mit Hilfe von Thapsigargin (TPG) überprüft. TPG ist ein spezifischer Inhibitor der Kalzium-ATPase vom SERCA-Typ, der die Kalzium-ATPase als nicht-kompetitiver Inhibitor irreversibel hemmt und somit den Kalzium-Rücktransport ins endoplasmatische Retikulum unterdrückt. (Thastrup *et al.*, 1990; Lytton *et al.*, 1991) Bei diesem Versuch wurden die Rohmembranen mit steigenden Konzentrationen an TPG versetzt und anschließend die SERCA2a-Aktivität gemessen (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.10). Mit zunehmender Menge an TPG verlor die NADH-Abnahme an Geschwindigkeit und somit die SERCA2a Ihre Aktivität. Die Kalzium-ATPase reagierte dabei sehr sensitive auf den Inhibitor. Mit der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  TPG verlor die SERCA2a schon etwa 20 % Ihrer Ausgangsaktivität, was sich mit der 10-fachen TPG-

Konzentration auf 80 % Aktivitätsverlust steigern ließ. Ab einer TPG-Menge von 80  $\mu\text{M}$  zeigte die SERCA2a nahezu keine Aktivität mehr (98 % Aktivitätsverlust) (**Abb. 32**). Unter diesen Bedingungen war nach Hemmung der SERCA2a kein weiterer NADH-Absorptionsabfall zu messen. Daraus konnte geschlossen werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen ausschließlich SERCA2a-Aktivität gemessen wurde und die Aktivität anderer ATPasen so gering war, dass kein Einfluss auf die Messergebnisse zu befürchten war. Somit hatte die SERCA2a-Aktivitätsmessung eine hohe Spezifität.

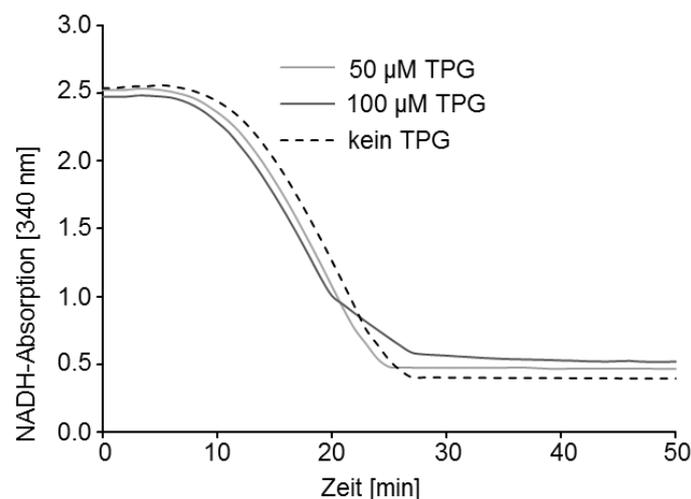


**Abb. 32: Nach SERCA2a-Hemmung mit TPG konnte kein weiterer NADH-Verbrauch gemessen werden.**

In enzymgekoppelten, NADH-abhängigen SERCA2a-Aktivitätsmessungen (photometrisch Messung bei 340 nm) wurde die Enzymaktivität der SERCA2a in Herzrohmembranen mit konzentrationsabhängigem Zusatz von Thapsigargin (TPG), einem spezifischen Inhibitor der SERCA2a, analysiert. Die SERCA2a reagierte auf die Inhibition durch TPG sehr sensibel. Mit 1  $\mu\text{M}$  Inhibitor verlor die  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase schon etwa 20 % Ihrer Aktivität. Ab 50  $\mu\text{M}$  TPG wies die SERCA2a schon eine stark verminderte Enzym-Aktivität (80 % Aktivitätsverlust) auf, die mit 100  $\mu\text{M}$  TPG nahezu vollständig aufgehoben werden konnte (2 % Restaktivität). Mit der steigenden Hemmung der SERCA2a konnte auch kein weiterer NADH-Abfall im Versuch gemessen werden, was die Anwesenheit anderer ATPasen ausschloss und auf eine hohe Spezifität des SERCA2a-Aktivitätsexperiments hinwies.

Um sicherzugehen, dass in den Experimenten durch TPG die SERCA2a spezifisch inhibiert wurde, sollte die SERCA2a-Spezifität von TPG überprüft werden. Hierfür wurde eine SERCA2a-unabhängige,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte ATPase, die Apyrase, verwendet. Die Apyrase wurde in Versuchen jeweils mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  TPG versetzt und die SERCA2a-Aktivität gemessen.

In diesen Experimenten wurde deutlich, dass selbst hohe Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) an TPG keinen Einfluss auf die Aktivität der Apyrase hatten (**Abb. 33**). Diese Ergebnisse bestätigten, dass TPG nicht unspezifisch alle ATPasen blockierte.

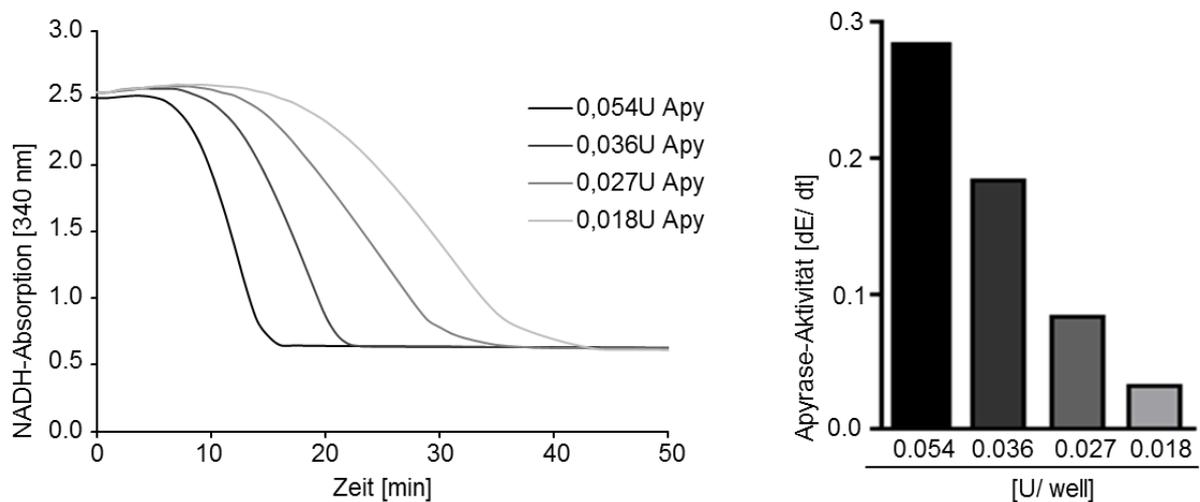


**Abb. 33: Thapsigargin inhibiert nicht die Apyrase**

Die Ergebnisse einer photometrischen Messung des NADH-Verbrauches bei 340 nm zeigen die Aktivität der Apyrase, einer membranständigen, Kalzium-aktivierten ATPase, mit Zusatz von Thapsigargin (TPG), einem selektiven, irreversiblen SERCA2a-Inhibitor. Die Aktivität der Apyrase konnte mit hohen Konzentrationen von 50 – 100  $\mu\text{M}$  TPG nicht inhibiert werden. Dies wies darauf hin, dass TPG nicht generell alle ATPasen blocken kann.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob und in welchem Aktivitätsbereich sich die photometrische Messung der NADH-Konzentration unter den beschriebenen Bedingungen

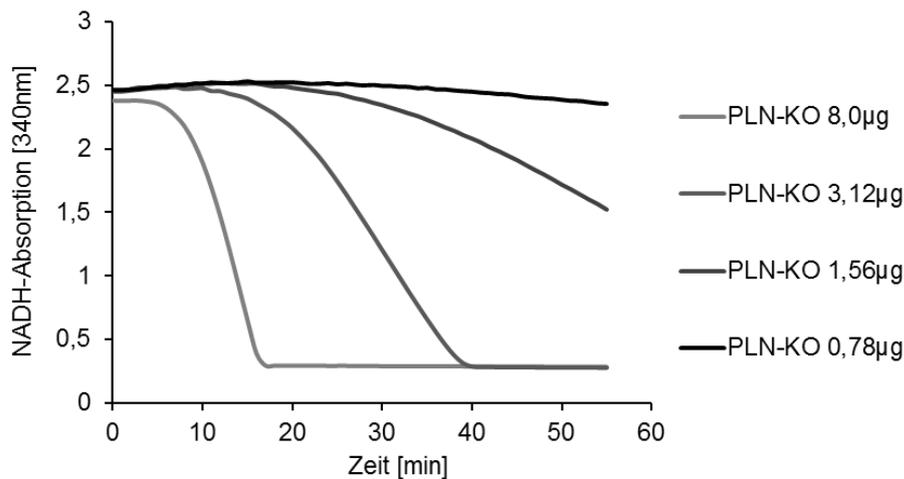
zur Quantifizierung von Enzymaktivitäten eignet. Hierfür wurde die Aktivität verschiedener Mengen an Apyrase bestimmt. Zu Beginn wurden Mengen an Apyrase eingesetzt, die etwa 100-fach höher lagen als in **Abb. 34** gezeigt. Diese hohen Apyrase-Konzentrationen zeigten dabei alle die gleiche Aktivitäts-Geschwindigkeit (Daten nicht gezeigt). Somit lief das SERCA2a-Aktivitätsexperiment ab einer bestimmten ATPase-Konzentration in eine Sättigung, die keinen weiteren messbaren Unterschied der ATPase-Aktivitäten aufzeigen konnte. Anschließend wurde daher die Aktivitätsmessung mit 100-fach geringeren Apyrase-Konzentrationen durchgeführt. In einem Konzentrationsbereich von etwa 0,01 - 0,5 U/ 250  $\mu$ l zeigten die Messungen eine direkte Korrelation der NADH-Absorptionsabnahme bei 340 nm und der eingesetzten Enzymmenge (**Abb. 34**). Die Zeitspanne zwischen Beginn und Ende der Reaktion lag unter den gewählten Bedingungen zwischen ca. 10 und 60 min.



**Abb. 34: Konzentrationsabhängigkeit der SERCA2a-Aktivitätsmessung.**

Messung der NADH-Absorptionsabnahme bei 340 nm von unterschiedlichen Mengen an Apyrase im Aktivitätsexperiment. Die Aktivitätsmessungen von steigenden Apyrase (Apy)-Konzentrationen zeigte eine direkte Korrelation zur NADH-Absorptionsabnahme bei 340 nm. Dabei wurde das enzymatische Experiment für die konzentrationsabhängige Auswertung der ATPase-Aktivität validiert.

Analog sollte dieses Zeitfenster für die Messungen der SERCA2a-Enzymaktivität in Mäuseherzen verwendet werden. Um die optimale Menge an Rohmembran zu ermitteln wurden Rohmembranen einer PLN-KO Maus in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die SERCA2a-Aktivität mit dem Aktivitäts-Versuch über 60 min photometrisch bei 340 nm gemessen. Die Versuche zeigten auch bei den Rohmembranen der Mäuse eine konzentrationsabhängige Enzym-Aktivität. Außerdem zeigte sich in diesem Experiment, dass 3,12 µg Rohmembran pro Reaktionsansatz gut geeignet waren. Mit dieser Konzentration war das Ende des Reaktionsablaufes zwischen 30 min und 40 min erreicht und damit ein „Zeitpuffer“ sowohl nach oben als auch nach unten gewährleistet, der die Messung der unterschiedlichen SERCA2a-Aktivitäten in den transgenen Mäusen sichern sollte.



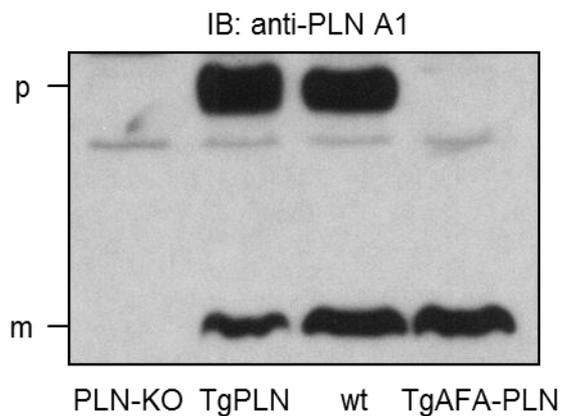
**Abb. 35: Abhängigkeit der SERCA2a-Aktivität mit verschiedenen Mengen an Herz-Rohmembran.**

Photometrische SERCA2a-Aktivitätsbestimmung von unterschiedlichen Herz-Rohmembran-Mengen einer PLN-KO Maus ergab bei 340 nm unterschiedliche Zeitfenster der Enzym-Aktivität. Dabei wurde die Menge von 3,12 µg pro Versuchsansatz als beste Rohmembran-Menge ermittelt, da sie Ihr Reaktionsende bei etwa 40 min aufwies. Da das komplette Zeitfenster aber über 60 min verlief, war für die geplanten Experimente somit ein guter „Zeitpuffer“ nach oben und unten vorhanden um den breiten Aktivitätsbereich der unterschiedlichen Mutanten messen zu können.

### 3.11 Verminderte SERCA2a-Inhibition durch AFA-PLN in transgenen Mauserzen

In unseren enzymgekoppelten Experimenten wurden die SERCA2a-Aktivitäten von PLN-KO-, TgPLN-, Wildtyp (wt; FVB)- und TgAFA-PLN-Mäusen verglichen. Die PLN-KO-Tiere stammten aus dem Labor von E.G. Kranias (Luo *et al.*, 1994), alle weiteren transgenen Tiere (TgPLN; TgAFA-PLN) wurden über Pronukleus-Injektion selbst generiert und gezüchtet. Die Wildtyp-Tiere (FVB) wurden von der Firma Harlan bezogen und ebenfalls für die Zucht verwendet.

Im ersten Schritt wurden die verschiedenen transgenen Mauslinien auf Ihre PLN-Expression in den Rohmembranen untersucht. Hierfür wurden Rohmembranen der verschiedenen Mauslinien im *Western blot*-Experiment mit anti-PLN A1-Antikörper analysiert. Dabei zeigten die PLN-KO-Mäuse keine PLN-Expression, die Wildtyp-Maus wie auch die TgPLN-Maus die Expression von Monomer und Pentamer und die AFA-PLN-Maus eine reine Expression von PLN-Monomer (**Abb. 36**).

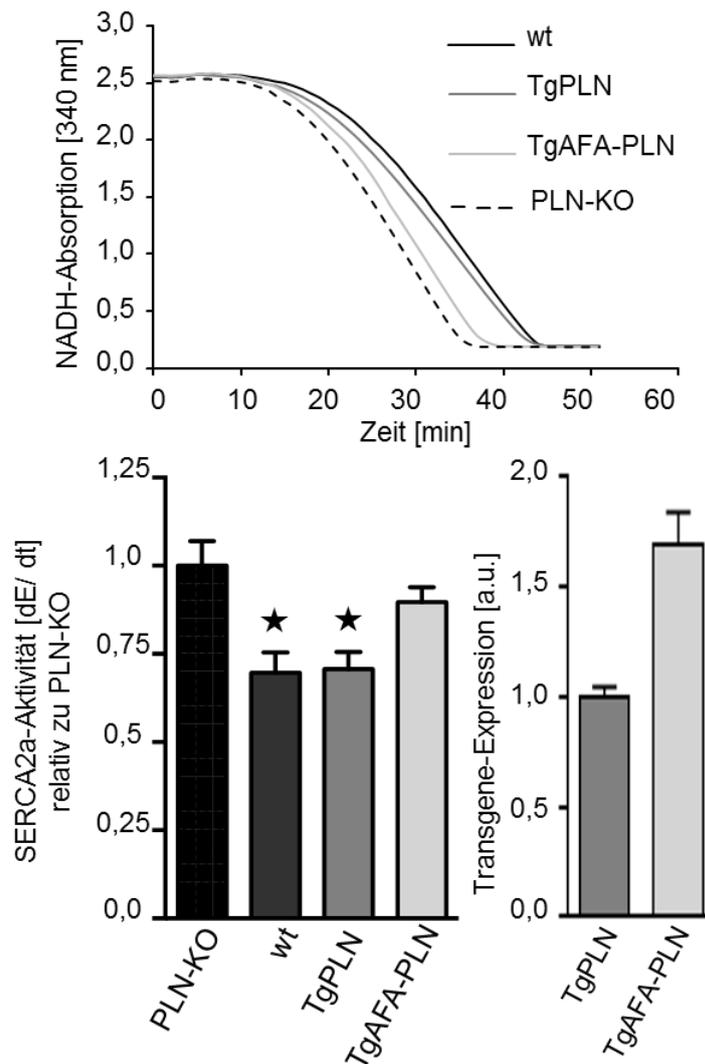


**Abb. 36: Expression von PLN-Monomer und -Pentamer der verschiedenen transgenen Mauslinien.**

*Western blot*-Experimente mit Herz-Lysaten der verschiedenen Mauslinien zeigten die PLN-Expression der verschiedenen PLN-Mutationen in den Mäusen. Die PLN-KO-Maus zeigte die vollständige Aufhebung der PLN-Expression, die AFA-PLN-Maus hingegen exprimiert ausschließlich monomeres PLN und der Wildtyp (wt; FVB) wie auch der transgene Wildtyp (TgPLN) zeigte die Expression von Monomer und Pentamer in etwa gleichem Verhältnis. p, Pentamer; m, Monomer; IB, *Immunoblot*; anti-PLN A1-Antikörper, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN).

Die Herz-Rohmembranen der verschiedenen Mauslinien wurden in einer 96-well-Platte mit Hilfe des Reaktionsansatzes, der alle Enzyme (Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase) sowie NADH enthält, im Photometer (EnVision) über 60 min bei 37 °C kontinuierlich gemessen. Die Reaktion wurde durch ATP-Zugabe gestartet (siehe Material und Methoden Kapitel 2.3.10).

In den Versuchen zeigte die SERCA2a in PLN-KO-Herz-Rohmembranen die höchste Aktivität ( $100 \pm 7 \%$ ). In wt- und TgPLN-Herzen war dagegen die geringste Aktivität ( $70 \pm 6 \%$ ) zu messen, was auf die Anwesenheit des PLN und dessen Inhibition der SERCA2a zurückzuführen war (**Abb. 37**). Bei den TgAFA-PLN-Mäusen, die ausschließlich monomeres PLN exprimierten, bewegte sich die SERCA2a in einem Aktivitätsbereich von  $90 \pm 4 \%$ . Die mittlere SERCA2a-Aktivität der TgAFA-PLN-Herzen, war somit etwa 20 % höher als in wt- oder TgPLN-Herzen. Obwohl die Expression an monomerem PLN in TgAFA-PLN-Herzen erhöht war, schien also die verstärkte SERCA2a-Aktivität durch eine verminderte Inhibition der SERCA2a in Abwesenheit der Pentamere verursacht zu sein.



**Abb. 37: Erhöhte SERCA2a-Aktivität in Abwesenheit der PLN-Pentamere.**

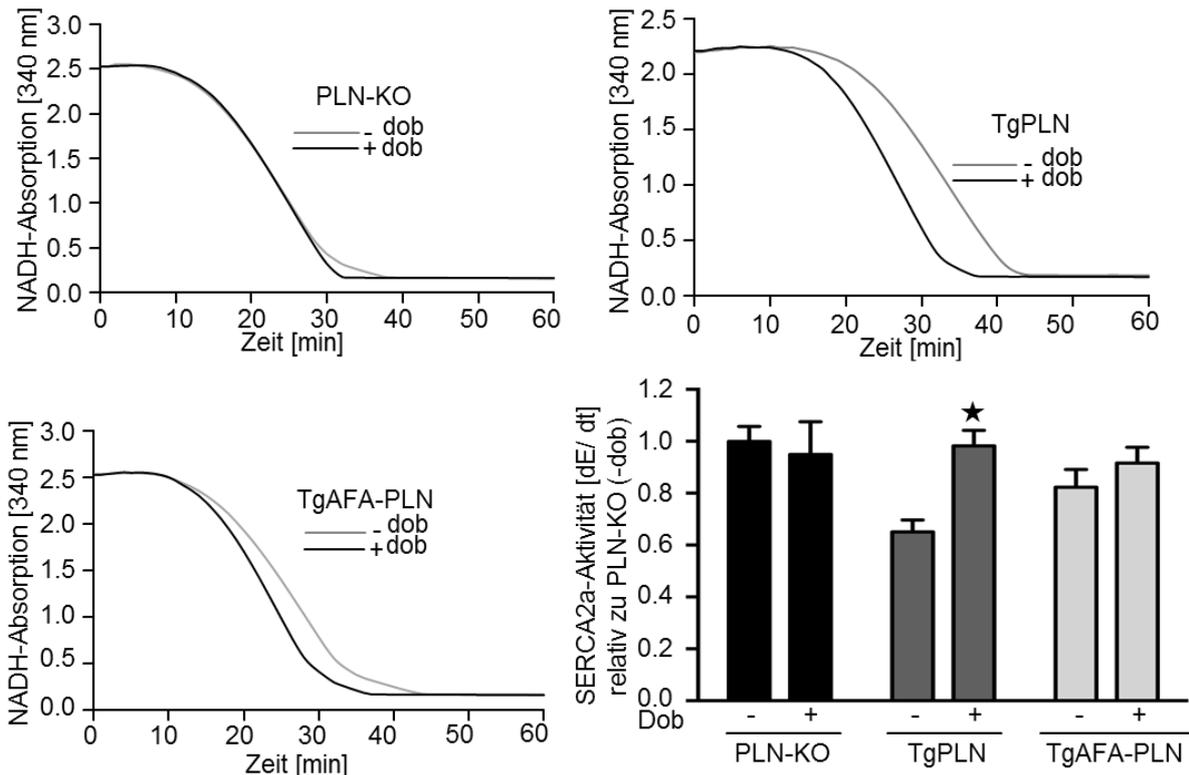
Die Enzymaktivität wurde in Herz-Rohmembranen von PLN-defizienten Mäusen (PLN-KO), von Wildtyp-PLN-Mäusen (wt, TgPLN) oder TgAFA-PLN-Mutanten bestimmt. Die SERCA2a-Aktivität in Wildtyp-PLN exprimierenden Mäusen (wt, TgPLN) war im Vergleich zu PLN-KO- und TgAFA-PLN-Mäusen deutlich reduziert, was auf eine stärkere SERCA2a-Inhibition hindeutete. Das Histogramm fasst die relativen Enzymaktivitäten zusammen, die durch die Geschwindigkeit der NADH-Absorptionsabnahme berechnet wurden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit SEM von 9 – 12 unabhängigen Experimenten pro Gruppe ermittelt. \* $P < 0,05$  vs. PLN-KO und vs. TgAFA-PLN (ANOVA).

### 3.12 Pentamere erhöhen die Regulationsmöglichkeit der SERCA2a

Da die SERCA2a-Aktivitätsmessungen basal zwischen den TgAFA-PLN-Mäusen, die ausschließlich PLN-Monomer exprimieren, und den Wildtyp-Tieren (wt; TgPLN) signifikante Unterschiede in der Aktivität der SERCA2a zeigten, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich die SERCA2a-Aktivität nach PLN-Phosphorylierung in den unterschiedlichen transgenen Tieren verändert.

Hierfür wurden aus nicht-stimulierten Mäuseherzen und aus Herzen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit einer hohen Dosis Dobutamin (3.75  $\mu$ M/ ml) Rohmembranen präpariert und wieder SERCA2a-Aktivitätsexperimente durchgeführt.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass sich nach PLN-Phosphorylierung die SERCA2a-Aktivitäten der beiden Mauslinien TgPLN und TgAFA-PLN auffallend unterschiedlich verhielten. Die SERCA2a-Aktivität stieg nach Dobutamin-Gabe in TgPLN Mäusen um 51 % an. In TgAFA-PLN Mäusen hingegen steigerte sich die Aktivität der SERCA2a nur um 11 %. In diesem Ergebnis zeigte sich, dass unter Anwesenheit der Pentamere die  $\beta$ -adrenerge Stimulation und damit die PLN-Phosphorylierung einen größeren Effekt auf die SERCA2a-Aktivität hatte als in den ausschließlich PLN-Monomer-exprimierenden Mäusen. Die Dobutamin-Gabe bei PLN-KO-Mäusen hatte keinen Effekt, da hier das zu phosphorylierende PLN fehlte. Die basal sehr hohe SERCA2a-Aktivität der PLN-KO-Mäuse konnte nicht verändert werden (**Abb. 38**). In diesen Ergebnissen der SERCA2a-Aktivitätsmessungen der verschiedenen transgenen Mäuse bestätigte sich die Annahme, dass PLN-Pentamere Einfluss auf die Regulation der SERCA2a-Aktivität durch PLN nehmen.



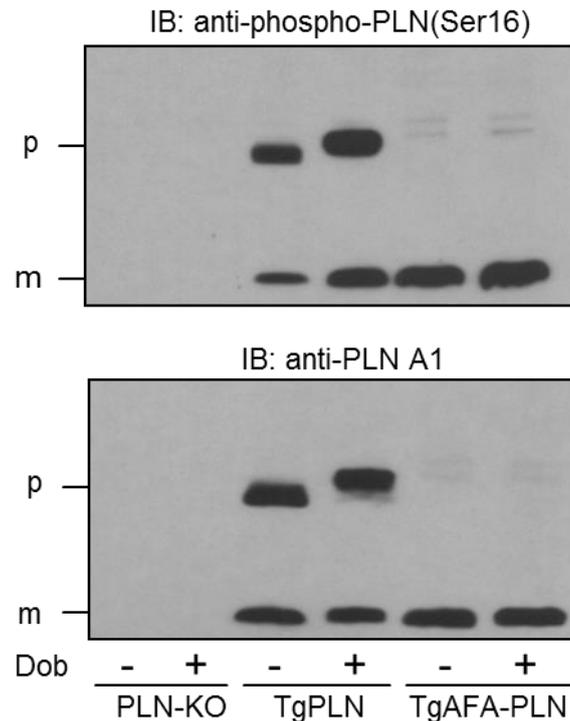
**Abb. 38: In Anwesenheit der PLN-Pentamere zeigte die SERCA2a-Aktivität nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation einen stärkeren Anstieg.**

Die enzymatische Aktivität der SERCA2a wurde mittels photometrischer Messung des NADH-Verbrauchs in Herzen von PLN-defizienten Mäusen (PLN-KO) und Mäusen, die ausschließlich Wildtyp-PLN-Transgen (TgPLN) oder AFA-PLN-Transgen (TgAFA-PLN) exprimierten, bestimmt. Dabei wurden Tiere zuvor mit einer hohen Dosis Dobutamin (Dob; 3,75  $\mu$ g/ ml, 8 min) behandelt. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt. Die Herzen der TgPLN zeigten dabei nach Dobutamin-Stimulation einen ausgeprägten Anstieg der enzymatischen SERCA2a-Aktivität als das ausschließlich Monomer-exprimierende TgAFA-PLN Herz. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert mit SEM von 4 unabhängigen Experimenten pro Gruppe. \*P <0,05 vs. unstimuliert (ANOVA).

### 3.13 Phosphorylierungsmuster von PLN in transgenen Mäusen mit und ohne Pentamere

Eine mögliche Erklärung der im SERCA2a-Aktivitätsexperiment gemachten Beobachtungen lieferten die Phosphorylierungsmuster von stimulierten und unstimulierten Mausherzen. Unstimulierte Mausherzen mit PLN-Pentamer (wt, TgPLN) zeigten basal eine deutliche

Pentamer-Phosphorylierung und nur ein geringer Teil der Monomere war phosphoryliert. Nach Dobutamin-Stimulation der Herzen stieg die Phosphorylierung beider PLN-Formationen, besonders aber die des Monomers stark an. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung des Monomers in TgAFA-PLN-Herzen bereits basal stark ausgeprägt und stieg nach Stimulation nur geringfügig an (**Abb. 39**).



**Abb. 39: Stärkere Zunahme der Monomer-Phosphorylierung in TgPLN als in TgAFA-PLN nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation der Mauserzen.**

*Western blot*-Analysen von Mauserzgewebe wiesen eine basal stärkere Phosphorylierung der Monomere (m) in TgAFA-PLN- als in TgPLN-Mäusen auf. Dobutamin induzierte einen stärkeren Anstieg der Monomer-Phosphorylierung in Anwesenheit der Pentamere (p). IB, *Immunoblot*; anti-phospho-PLN(Ser16), Antikörper gegen Serin16-phosphoryliertes PLN; anti-PLN A1, Antikörper gegen PLN (Gesamt-PLN).

Die hohe basale PLN-Phosphorylierung von unstimuliertem TgAFA-PLN-Herzen stimmte mit der Beobachtung der geringen SERCA2a-Inhibition überein (siehe Ergebnisse Kapitel 3.11).

Dagegen erklärte die niedrige Phosphorylierung der Monomere im unstimulierten TgPLN-Herz die ~ 30 % stärkere Inhibition der SERCA2a (**Abb. 38** und **Abb. 39**).

Zusammenfassend zeigten die Aktivitäts-Versuche, dass eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation sowohl in TgPLN als auch in TgAFA-PLN-Herzen zu einer maximalen SERCA2a-Aktivität führte, die in PLN-KO-Herzen mit und ohne Dobutamin-Stimulation zu sehen war. Vergleich man nun die Phosphorylierungsmuster mit der SERCA2a-Inhibition, so wurde klar, dass PLN-Pentamere in wt- und TgPLN-Herzen die Phosphorylierung der Monomere beschränken können. Diese Einschränkung führte zu einer gesteigerten Inhibition der SERCA2a, die wiederum durch Stimulation der PKA und somit Phosphorylierung von PLN vollständig aufgehoben werden konnte und eine stärkere Aktivitätssteigerung der SERCA2a nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation auslöste.

## 4 Diskussion

PLN liegt im Herzen als Monomer sowie als Pentamer vor. Es ist bekannt, dass PLN-Monomere durch direkte Interaktion mit der Kalzium-ATPase SERCA2a deren Aktivität durch Inhibition regulieren (Kimura *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998). Die Rolle der PLN-Pentamere ist noch weitgehend unklar. Bislang geht man davon aus, dass es sich bei den Pentameren um eine Speicherform der phosphorylierten Monomere handelt (Kimura *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Einfluss der PLN-Pentamere auf die PKA-abhängige PLN-Inaktivierung untersucht. Dazu wurden in transfizierten Zellen und in Mausmodellen die Phosphorylierungsmuster von PLN-Monomeren und Pentameren in Wildtyp-PLN und in PLN-Mutanten, die entweder die Bildung der PLN-Pentamer bevorzugten oder vollständig inhibierten, miteinander verglichen. Ferner wurde die Rolle der PLN-Pentamere bei der Regulation der SERCA2a mit Hilfe von Immunpräzipitationsversuchen sowie Aktivitätsmessungen untersucht. Es stellte sich heraus, dass PLN-Pentamere sowohl auf die PLN-Phosphorylierung als auch auf die Regulation der SERCA2a-Aktivität Einfluss nehmen, so dass die für PLN-Pentamere angenommene passive Rolle im Regulationsmechanismus des Kalziumhaushaltes von Herzmuskelzellen neu überdacht werden muss.

### 4.1 Der Cysteinrest in Position 41 des PLN ist kritisch für die Oligomerisierung

Zur Generierung von PLN-Mutanten mit ausgeprägter (PLN-I45A) oder eingeschränkter (AFA-PLN; PLN-L37A) Neigung zur Oligomerisierung wurden gut charakterisierte Konstrukte verwendet, die später hinsichtlich ihrer Phosphorylierungssensitivität und -kinetik untereinander sowie mit Wildtyp-PLN verglichen werden sollten (Kimura *et al.*, 1997; Karim *et al.*, 2000; Zvaritch *et al.*, 2000; Zamoon *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2008).

Die AFA-PLN-Mutante, bei der die drei Cysteine des transmembranären Bereiches gegen Alanin oder Phenylalanin ausgetauscht wurden (C36A+C41F+C46A) zeigte die Fähigkeit der Oligomerdestabilisierung und bildete somit keine Pentamere, ohne dass dabei die Interaktion mit der Kalzium-ATPase SERCA2a gestört war (Fujii *et al.*, 1989; Toyofuku *et al.*, 1994). Obwohl PLN-Pentamere auf Grund ihrer dicht gepackten Anordnung von Leucin-Isoleucin-Bausteinen in der Transmembranregion in 1 %igem SDS beständig sind (Simmerman *et al.*, 1996), zeigte die AFA-PLN-Mutante im *SDS-PAGE* ausschließlich Monomere (**Abb. 9**). Auch in der Literatur wurde die AFA-PLN-Mutante in experimentellen Versuchsansätzen sehr häufig als ausschließlich Monomer-exprimierende, voll funktionsfähige Mutante verwendet (Zamoon *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2008; Traaseth *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2011; Masterson *et al.*, 2011).

Um die für die Destabilisierung der Pentamere verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren, wurden die drei Cysteinreste der Transmembranregion einzeln gegen Alanin oder Phenylalanin ersetzt (PLN-C36A; PLN-C41F; PLN-C46A). Im *Western blot*-Experiment zeigte sich dabei, dass die PLN-C41F-Mutation den wesentlichen Grund für die fehlende Pentamerbildung darstellte. Sie lag ausschließlich in monomerer Form vor, wohingegen die anderen beiden Mutationen (PLN-C36A und PLN-C46A) weiterhin Pentamere bilden konnten (**Abb. 10**). Somit hat das Cystein an Position 41 eine starke Auswirkung auf die Oligomerisierungseigenschaften des PLN. Bei Austausch gegen Phenylalanin kann es im Zusammenspiel mit den beiden anderen Cysteinen an Position 36 und 46, die gegen Alanin ausgetauscht sind (AFA-PLN) die Pentamerbildung destabilisieren.

## 4.2 PLN-Pentamer wie -Monomer stellen ein mögliches Substrat der PKA dar

PLN-Monomere werden von der PKA in der sogenannten R-Konformation erkannt und phosphoryliert. In diesem Zustand ist der zytosolische Bereich des PLN-Proteins von der SR-Membran-abgehoben (Masterson *et al.*, 2011). Die Möglichkeit der PKA-abhängigen Pentamer-Phosphorylierung wurde bislang noch nicht untersucht. Man geht davon aus, dass phosphorylierte Pentamere aus der Oligomerisierung phosphorylierter Monomere resultieren (Kimura *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998). Eine Verstärkung der Pentamer-Phosphorylierung würde demnach durch die gesteigerte Oligomerisierung nach Phosphorylierung der Monomere verursacht (Jones *et al.*, 1985; Cornea *et al.*, 1997).

In transfizierten HEK293-Zellen und im Mausmodell wurden die Charakteristika der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLN-Monomeren und Pentameren in Wildtyp-PLN und PLN-Mutanten, die entweder die Oligomerisierung bevorzugten oder komplett inhibierten, verglichen. In Wildtyp-PLN ergab die Stimulation der PKA mit steigenden Forskolin-Konzentrationen einen parallelen Anstieg der Phosphorylierung der Pentamere und der Monomere (**Abb. 14**), wobei die Phosphorylierung des Pentamers mit geringen Mengen Forskolin (0,025  $\mu\text{M}$ ) im *Western blot*-Experiment stärkere Signale zeigte als im Monomer. Da das Expressionsverhältnis von Monomer und Pentamer mit und ohne PLN-Phosphorylierung stabil blieb, konnte aus diesen Versuchen geschlossen werden, dass sowohl Pentamer als auch Monomer PKA-abhängig phosphoryliert werden können. Dabei schien das Pentamer das sensitivere PKA-Substrat zu sein. In den parallel und analog durchgeführten Phosphorylierungsexperimenten mit der ausschließlich Monomer-exprimierenden AFA-PLN-Mutante zeigten sich interessante Unterschiede im Vergleich zu PLN-Monomeren des Wildtyp-PLN, denn in Abwesenheit von PLN-Pentameren war bereits mit einer 10-fach geringeren Forskolin-Konzentration ein maximales Phosphorylierungssignal der Monomere erreicht. Während die PKA grundsätzlich bevorzugt PLN-Pentamere

phosphoryliert, steigt in Abwesenheit der Pentamere die Monomer-Phosphorylierung an da das Pentamer als Kompetitor für die PKA fehlt (vgl. **Abb. 14** und **Abb. 15**).

In den zeitabhängigen Phosphorylierungs-Versuchen wurde dieser Zusammenhang ebenfalls deutlich. In Wildtyp-PLN zeigten die PLN-Pentamere eine starke basale Phosphorylierung von ca. 40 % der maximal möglichen Phosphorylierung, wohingegen die Phosphorylierung der Monomere im Wildtyp-PLN hier noch gering war (**Abb. 23**). PLN-Mutanten, die die Pentamerbildung inhibierten (AFA-PLN, PLN-L37A) waren dagegen bereits basal deutlich phosphoryliert. Nach Stimulation der Phosphorylierung durch Forskolin erreichten die PLN-Pentamere nach 30 s - 2 min einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung, die Monomere dagegen erst nach etwa 10 min. AFA-PLN und PLN-L37A dagegen waren schon nach 30 s - 2 min signifikant stark phosphoryliert.

Zusammenfassend konnte somit festgestellt werden, dass die Sensitivität und die Kinetik der Pentamer-Phosphorylierung im Vergleich zu Monomeren höher ist. Dies hat zur Folge, dass PLN-Monomere in Anwesenheit von Pentamer geringer und zeitverzögert phosphoryliert werden. Die reduzierte basale Phosphorylierung der Monomere würde zu einer starken Inhibition der SERCA2a führen und zu einer verlangsamten myokardialen Relaxation. Da der Unterschied in der Phosphorylierung von Monomeren und Pentameren mit der Dauer der Stimulation abnahm und das Phosphorylierungsmaximum in allen Mutanten ähnlich zu sein schien, ist davon auszugehen, dass in allen Mutanten eine vollständige Inaktivierung des PLN und damit eine maximale SERCA2a-Aktivität erreicht werden kann. Die Pentamer-Phosphorylierung kann somit nicht durch die Zunahme der Oligomerisierung nach PKA-abhängiger Phosphorylierung des Monomers begründet sein, da die Zunahme der Pentamer-Phosphorylierung keine Verschiebung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses über die Zeit der PKA-abhängigen Forskolinstimulation zeigte. Somit können nicht nur Monomere sondern auch Pentamere PKA-abhängig phosphoryliert werden.

### 4.3 Das Monomer-Pentamer-Verhältnis bleibt nach PLN-Phosphorylierung stabil

In der Literatur wird angenommen, dass PLN-Monomere und -Pentamere in einem dynamischen Gleichgewicht existieren, was durch Studien mit rekombinantem PLN in Phospholipidmembranen über Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) analysiert wurde (Cornea *et al.*, 1997). Die dabei durchgeführten Experimente zeigten nach 2 Stunden PKA-abhängiger PLN-Phosphorylierung eine verminderte Menge an Membran-Lipiden, die in direktem Kontakt mit der Transmembranregion von PLN standen. Die Autoren schlossen aus diesem Ergebnis, dass die PKA-abhängige PLN-Phosphorylierung die Durchschnittsgröße der PLN-Oligomere ansteigen ließ, was durch die Abnahme der Nettoladung (+3 zu +1) und die konsequent reduzierte elektrostatische Abstoßung zwischen den Protomeren zu begründen sei. (Chiesi and Schwaller, 1989; Fujii *et al.*, 1989; Seidel *et al.*, 2008). Es bleibt jedoch unklar, ob sich das Monomer-Pentamer-Verhältnis von rekombinantem PLN in einer künstlichen Lipid-Doppelschicht "physiologisch" verhält - speziell während der Phosphorylierung - und ob sich die Helix-Struktur des Pentamers in der künstlichen Membran nicht verändert. Da die Membran einen entscheidenden Parameter für die Pentamerbildung des PLN darstellt, könnten nativ nicht vorkommende Fettsäuren die Oligomerisierungseigenschaften des PLN deutlich beeinflussen.

Im Gegensatz zu diesen Strukturanalysen bleibt das Mengen-Verhältnis von PLN-Pentamer und Monomer in Zellen vor und nach Phosphorylierung in 1 %igem SDS-PAGE stabil (Wegener and Jones, 1984; Toyofuku *et al.*, 1994). In den eigenen Ergebnissen wurden sowohl in HEK293AD-Zellen als auch in Kardiomyozyten von Mäusen zu keinem Zeitpunkt phosphorylierungsabhängig Veränderungen des Monomer-Pentamer-Verhältnisses beobachtet (**Abb. 19**, **Abb. 20**). Auch die PLN-Mutanten, die entweder eine (PLN-S16A) oder beide (PLN-S16AT17A) Phosphorylierungsstellen verloren hatten, zeigten keine Verschiebung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses (**Abb. 21**). Die eine konstitutive Phosphorylierung simulierende Mutante (PLN-S16E) zeigte ebenfalls ein stabiles Verhältnis

von Monomer und Pentamer (**Abb. 21**). Die Monomer-Pentamer-Verhältnisse der Mutanten waren auch mit dem Verhältnis des Wildtyp-PLN im 1 %igen SDS-Gel vergleichbar. Das stabile Monomer-Pentamer-Verhältnis wurde von Arkin et al. durch eine dicht gepackte Doppelwendel (*coiled-coil*)-Struktur des Pentamers erklärt, welches durch das Detergenz SDS nicht angegriffen werden kann (Arkin et al., 1994). Nur Detergenzien wie Triton X-100 oder Hitze führt zur Dissoziation des Pentamers. Ob nun *in vivo* das PLN nach Phosphorylierung vermehrt oligomerisiert (wie bei rekombinantem PLN in künstlichen Membranen) oder das Monomer-Pentamer-Verhältnis stabil bleibt (wie in 1 %igen SDS-Gelen), kann letztlich aber nicht zuverlässig beantwortet werden. In jedem Fall erlauben die stabilen Monomer - Pentamer-Fractionen in den *Western blot*-Analysen nach SDS-PAGE der vorliegenden Arbeit die Schlussfolgerung, dass die erhöhte Menge an phosphorylierten Pentameren unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht aus einer Erhöhung des Monomer-Pentamer-Verhältnisses resultiert.

Als mögliche Erklärung für die starken Phosphorylierungssignale der PLN-Pentamere könnte ferner eine rasche Oligomerisierung von PLN-Monomeren binnen einer Minute nach PKA-abhängiger Phosphorylierung in Frage kommen. Dieser Fall erscheint jedoch ausgeschlossen, weil Robia et al. mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)-zeigen konnten, dass der Übergang zwischen Oligomer und Monomer nur sehr langsam (länger als 1 min) stattfindet (Robia et al., 2007). Diese Beobachtung unterstützt die hier vertretene Ansicht, dass PLN-Pentamere und Monomere in einem relativ stabilen Gleichgewicht vorliegen. Ein möglicher Protomer-Austausch findet deutlich langsamer als die Kinetik der PKA-abhängigen Phosphorylierung statt. Außerdem könnte in diesem Fall die für Wildtyp-PLN im *Western blot*-Experiment erkannten phosphorylierten Monomere auch durch Dissoziation der phosphorylierten Pentamere entstanden sein.

#### 4.4 Die Phosphorylierung der PLN-Pentamere verläuft stufenweise

Die sich klar unterscheidenden Phosphorylierungsmuster von Monomeren und Pentameren wurde mit Hilfe des *PhosTag*<sup>TM</sup>-Zusatzes im *SDS-PAGE* nochmals bestätigt. In diesen Experimenten wurden die Phosphorylierungsmuster von PLN-Monomeren und Pentameren mit und ohne Stimulation der PKA unabhängig von phosphorylierungsspezifischen Antikörpern analysiert (Wildtyp-PLN; AFA-PLN). Bei diesen Versuchen wurde nochmals deutlich, dass die Phosphorylierung der PLN-Pentamere im Wildtyp-PLN der Monomer-Phosphorylierung vorausgeht (**Abb. 22** und **Abb. 23**). Erst nach längerer PKA-Stimulation erreichen die Pentamere und Monomere ein vergleichbares Phosphorylierungsniveau (**Abb. 23**). Die quantitative Auswertung der Phosphorylierung in Wildtyp-PLN mit Hilfe des Phosphat-bindenden-Tag (*PhosTag*<sup>TM</sup>, Wako) im *SDS-PAGE* zeigte das Pentamer im basalen Zustand mit keinem ( $p_0$ ), einem ( $p_1$ ) oder maximal zwei ( $p_2$ ) phosphorylierten Protomeren (**Abb. 22**). Die Monomere im Wildtyp-PLN lagen dabei basal unphosphoryliert ( $m_0$ ) vor. Nach PKA-abhängiger Phosphorylierung mit Forskolin stieg die Anzahl der phosphorylierten Protomere auf fünf pro Pentamer ( $p_1$ - $p_5$ ) an (**Abb. 22**). Somit scheint die Pentamer-Phosphorylierung einen stufenweisen Verlauf zu besitzen. Das Pentamer bevorzugt dabei keinen bestimmten Phosphorylierungszustand oder durchläuft eine schnelle PKA-abhängige Phosphorylierung, die zur kompletten Phosphorylierung der Oligomere im Pentamer führen würde, denn zu jeder Zeit war im Wildtyp-PLN eine unphosphorylierte Bande ( $p_0$ ) des Pentamers zu detektieren. Interessanterweise waren selbst nach intensiver Stimulation unter Bedingungen, die ein maximales Phosphorylierungssignal induzierten, in der Mehrzahl der Pentamere nicht alle Protomere phosphoryliert. Vielmehr lagen auch dann noch Pentamere mit vier, drei, zwei oder auch nur einem Phosphat vor. Die Kapazität des Pentamers als „Phosphat-Fänger“ wäre also auch nach intensiver PKA-Stimulation und Phosphorylierung noch nicht ausgeschöpft. Auch im *PhosTag*<sup>TM</sup>-*SDS-PAGE* stieg die Phosphorylierung der Monomere erst dann, wenn bereits viele Protomere der Pentamere phosphoryliert waren. In Abwesenheit von Pentameren (AFA-PLN) dagegen waren, wie bei

*Western blot*-Analysen unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper gezeigt, bereits basal die Monomere zum Teil phosphoryliert. Die beobachteten Phosphorylierungsmuster deuten darauf hin, dass Pentamere die Phosphorylierung der Monomere „abpuffern“ können und so deren Interaktion mit der SERCA2a bis zu einem gewissen Punkt sichern. In Phasen der Ruhe würde dem Herzen damit durch die Anwesenheit von Pentameren eine langsamere Relaxation ermöglicht. Erst mit zunehmender Phosphorylierung der Protomere im Pentamer scheint die PKA zur Phosphorylierung der Monomere zu wechseln (**Abb. 23**) und eine genauso starke Phosphorylierung der Monomere wie in Abwesenheit von Pentameren zu ermöglichen. Damit könnte die Aktivität der Kalzium-ATPase SERCA2a des Herzens in Situationen extremen Stresses trotz PLN-Pentameren auf ein Maximum erhöht werden.

#### **4.5 Das Pentamer stellt das bevorzugte Phosphorylierungssubstrat der PKA dar**

In der Literatur besteht Konsens, dass das Monomer die Form des PLN ist, die die SERCA2a inhibiert (Jones *et al.*, 2002; Akin *et al.*, 2010; Akin *et al.*, 2013), nach PKA abhängiger Phosphorylierung seinen inhibitorischen Effekt auf die SERCA2a verliert und durch Oligomerisierung in das Pentamer als inaktive Form übergeht (MacLennan and Kranias, 2003; Kranias and Hajjar, 2012). Da PLN-Pentamere auch vollständig oder teilweise unphosphoryliert vorliegen können (**Abb. 22**), kann die Oligomerisierung der Monomere nach deren Phosphorylierung nicht den einzigen Mechanismus der Pentamerbildung darstellen. Die Befunde dieser Arbeit legen vielmehr nahe, dass das Pentamer auch direkt als Substrat von der PKA phosphoryliert wird. Da Monomere und Pentamere in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, ist es schwierig die Phosphorylierungsmuster dieser beiden Formen getrennt experimentell zu untersuchen. Masterson *et al.* zeigte, dass die Konformation der PLN-Helix für seine Erkennung durch die PKA bedeutsam ist (Masterson *et al.*, 2011). Anhand bildgebender Untersuchungen von PLN-Analoga, die verschiedene

Konformationen des Monomers simulierten, zeigte diese Arbeitsgruppe, dass PLN im sogenannten R-Zustand am besten von der PKA erkannt wird. In dieser Konformation ist der zytosolische Teil des PLN von der Membran abgehoben und entfaltet. Ob das Pentamer ein mögliches PKA-Target darstellen könnte wurde bislang nicht weiter untersucht. Da die PKA-Affinität aber abhängig ist von der Konformation des PLN wäre es denkbar, dass die regelmäßige Struktur der PLN-Pentamere deren Interaktion mit der Kinase im Vergleich zu den Monomeren begünstigen könnte. In der Tat wird in Strukturanalysen des Pentamers neben einer Windrad- (*pinwheel*) Struktur eine Glockenblumen (*bellflower*)-Struktur diskutiert (Oxenoid and Chou, 2005; Robia *et al.*, 2005). Bei letzterer heben sich die zytosolischen Areale aller Protomere deutlich von der Membran ab und ragen nahezu senkrecht zur Membran in das Zytosol. Wenn man die Befunde von Masterson *et al.* (Masterson *et al.*, 2011) auf das Pentamer übertragen würde, wären dies sehr günstige Bedingungen für die PKA-Bindung. Außerdem nehmen alle bekannten Pentamer-Strukturen eine symmetrische Anordnung der fünf Protomere in gleichen Abständen an, so dass nicht von sterischen Behinderungen zwischen den Protomeren bei ihrer Interaktion mit der PKA auszugehen wäre.

Ein weiterer Hinweis aus der Literatur, dass PLN-Pentamere ein direktes PKA-Substrat darstellen könnten, ergibt sich aus der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Vostrikov *et al.* (Vostrikov *et al.*, 2013). Hier zeigten die Autoren, dass das PLN-Pentamer in einer Windrad (*pinwheel*) -ähnlichen Konformation stabil bleiben kann. Möglicherweise liegt dann mindestens ein Teil der PLN-Oligomere relativ fix als Pentamer vor und nimmt nicht oder allenfalls verzögert an dem postulierten dynamischen Prozess der Deoligomerisierung teil. Dieser Teil der Pentamere könnte also nur direkt von der PKA phosphoryliert werden. Eine direkte Interaktion zwischen PLN-Pentameren und PKA legen nicht zuletzt die Co-Immunpräzipitationsversuche der vorliegenden Arbeit nahe (**Abb. 27**). Hier war die Affinität der PKA zu Wildtyp-PLN (mit Pentameren) höher als zu der ausschließlich PLN-Monomer

exprimierenden AFA-PLN-Mutante. Als Konsequenz daraus könnte das PLN-Pentamer ein übergeordnetes Substrat der PKA darstellen und damit die Phosphorylierung der Monomere an der Position Serin 16 abschwächen. Dieses Modell wäre eine mechanistische Erklärung für die präferenzielle Phosphorylierung des pentameren Komplexes und der verminderten Phosphorylierung der Monomere in Anwesenheit der Pentamere. Die starken Phosphorylierungssignale der PLN-Pentamere in den zeit- und konzentrationsabhängigen Versuchen wären anhand dieses Modells durch die direkte PKA-Phosphorylierung der Pentamere zu erklären.

#### **4.6 Sowohl PLN-Monomer wie auch -Pentamer interagieren mit der Kalzium-ATPase SERCA2a**

Röntgenstrukturanalysen von Co-Kristallen, die sowohl SERCA2a als auch PLN beinhalteten, lokalisierten die Bindung der Monomere in einer Art „Rinne“ zwischen den Helices M2, M4, M6 und M9 der SERCA2a (Jones *et al.*, 2002; Toyoshima *et al.*, 2003; Akin *et al.*, 2010). An diese Stelle gebunden verhindern PLN-Monomere durch Konformationsänderung der SERCA2a die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die beiden Kalzium-Bindestellen der SERCA2a, die hier lokalisiert sind (Akin *et al.*, 2010; Akin *et al.*, 2013). Somit kann in diesem Zustand kein Kalzium durch die SERCA2a zurück ins sarcoplasmatische Retikulum transportiert werden. Weitere Strukturanalysen zeigten, dass auch das PLN-Pentamer an die SERCA2a binden kann (Stokes *et al.*, 2006). Glaves *et al.* zeigten mit Hilfe von Elektronenmikroskopie in 2D Co-Kristallen, dass PLN-Pentamere an einer völlig unabhängigen Stelle der SERCA2a in der M3-Helix binden konnten und diese Bindung auch nach Phosphorylierung stabil und geordnet blieb, wohingegen die Bindung der Monomere nach Phosphorylierung ungeordnet und diffus wurde (Glaves *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in den hier durchgeführten Co-Immunpräzipitationsversuchen sowohl in transfizierten HEK293AD-Zellen als auch in Mausherz-Rohmembranen eine Co-Lokalisation von SERCA2a, Pentameren und

Monomeren gefunden (**Abb. 28; Abb. 29**). Der Vergleich der Monomer-Pentamer-Verhältnisse vor und nach der Co-IP zeigte, dass die Pentamere möglicherweise mit einer höheren Affinität an die SERCA2a binden als die Monomere (**Abb. 28; Abb. 29**). Während PLN-Monomere nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation vollständig von SERCA2a dissoziierten, war unter diesen Bedingungen weiterhin eine Co-Immunpräzipitation von SERCA2a und PLN-Pentamer zu beobachten. Da deutlich weniger Pentamere in dieser Bindung zu finden waren als ohne Stimulation, reduziert die Dobutamin-Gabe auch die Interaktion zwischen SERCA2a und PLN-Pentameren (**Abb. 30**). Mögliche Erklärungen für diesen Befund sind entweder 1. eine Reduktion der Affinität der SERCA2a für PLN-Pentamere, die zu einer verringerten, aber nicht vollständigen Inhibition der Interaktion führt oder 2. eine vollständige Blockade der Interaktion zwischen SERCA2a und phosphorylierten PLN-Protomeren (ähnlich der Monomer-Bindestelle), wobei die Pentamere über nicht-phosphorylierte Protomere an SERCA2a gebunden bleiben. Schließlich hatten die Analysen mittels Phostag<sup>TM</sup>-SDS-PAGE gezeigt, dass selbst nach maximaler PKA-Stimulation ein Teil aller PLN-Protomere weiterhin unphosphoryliert vorliegen (**Abb. 22**).

Da für den Erhalt der Pentamere bei der Gewebeanalyse vor den Immunpräzipitations-Experimenten auf Detergenzien verzichtet wurde, ist davon auszugehen, dass die Proteine nicht vollständig isoliert, sondern an umgebende Proteine und Membranlipide gebunden in die Versuche eingesetzt wurden. Die Co-Immunpräzipitation von SERCA2a und PLN beweist daher nicht zwingend eine direkte Interaktion dieser Proteine. In jedem Fall zeigt sie aber, dass PLN-Pentamere und Monomere in den Herzlysaten nahe bei der SERCA2a lokalisiert sind. Dadurch erscheint die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die beobachtete reduzierte Phosphorylierung von PLN-Monomeren durch Pentamere auch auf die Aktivität der SERCA2a auswirkt, weil die dann unphosphorylierten PLN-Monomere an die ATPase binden und diese hemmen können.

#### 4.7 In Anwesenheit der PLN-Pentamere ist die SERCA2a-Aktivität vermindert

In Herzgewebe transgener Mäusen, die entweder ausschließlich Wildtyp-PLN (TgPLN) oder die AFA-Mutante (TgAFA-PLN) kardial überexprimierten, wurden im Vergleich zu PLN-defizienten (PLN-KO) Geschwistertieren die Folgen der beobachteten Phosphorylierungsmuster für die Aktivität der SERCA2a untersucht. Die dafür weiter entwickelten SERCA2a-Aktivitätsexperimente (Münch *et al.*, 2002) zeigten in PLN-KO- Herzen erwartungsgemäß die höchste ATPase-Aktivität ( $100 \pm 7 \%$ ). Die geringste SERCA2a-Enzymaktivität war in Herzgewebe von Wildtyp-Mäusen (FVB) und TgPLN-Mäusen zu messen ( $70 \pm 6 \%$ ). TgAFA-PLN-Mäuse, die ausschließlich PLN-Monomere exprimieren, zeigten dagegen eine weitaus höhere SERCA2a-Aktivität ( $90 \pm 4 \%$ ) als Wildtyp-PLN in FVB und TgPLN Herzen (**Abb. 37**).

Diese Ergebnisse spiegelten das Phosphorylierungs-Profil der Kinetik-Experimente von Wildtyp-PLN und AFA-PLN wider (**Abb. 23; Abb. 24**). Da die Monomere in Anwesenheit von Pentameren unter Basalbedingungen weitgehend unphosphoryliert vorlagen, war hier die Inhibition der SERCA2a am stärksten, wie im Experiment an der niedrigen SERCA2a-Aktivität zu erkennen war. In der AFA-PLN-Mutante dagegen war das Monomer (in Abwesenheit von Pentameren) bereits basal deutlich phosphoryliert (**Abb. 24**), was sich in den Messungen in einer höheren SERCA2a-Aktivität äußerte.

MacLennan und Mitarbeiter zeigten dagegen in ihren Arbeiten, dass Punktmutationen des PLNs, die mit dem Verlust der Oligomerisierung einhergehen, in den meisten Fällen mit einer verstärkten inhibitorischen Wirkung („*gain of function*“) auf die SERCA2a einhergehen (Kimura *et al.*, 1997). Die AFA-Mutante soll dabei die gleiche physiologische Aktivität besitzen wie Wildtyp-PLN, da die Punktmutationen an den Positionen C36, C41 sowie C46 keine Veränderung der funktionellen Aktivität verursachen (Fujii *et al.*, 1989; Kimura *et al.*,

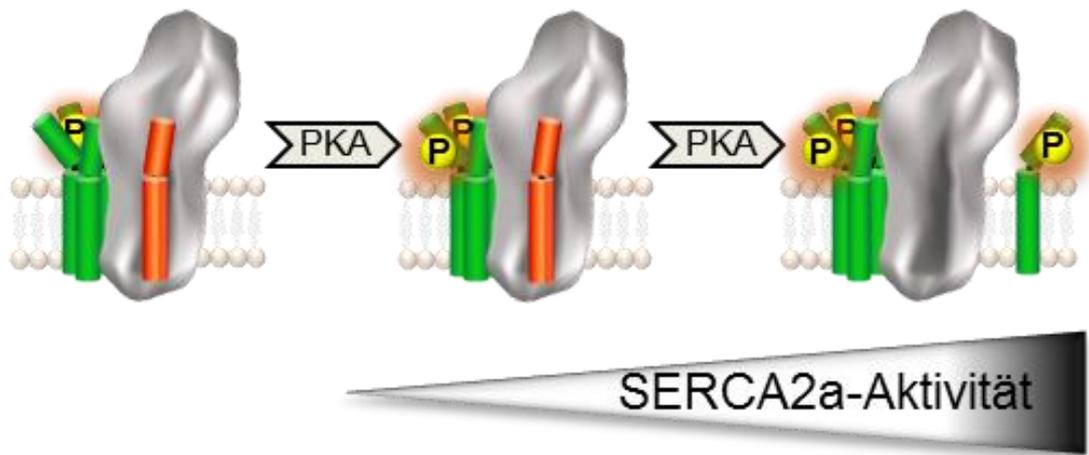
1997). In diesen Versuchen wurden PLN-Mutanten mit SERCA2a in HEK293-Zellen co-exprimiert und der Kalziumtransport in einer Mikrosomen-Präparation aus den Zellen gemessen. Es ist davon auszugehen, dass unter diesen Bedingungen PLN weitestgehend unphosphoryliert vorlag und somit seine maximale inhibitorische Aktivität gemessen wurde. Da PLN als Monomer die SERCA2a inhibiert, ist es daher nicht verwunderlich, dass die ausschließlich Monomer-exprimierenden Mutanten den Kalziumtransport stärker hemmten als Wildtyp-PLN.

Die Messungen der SERCA2a-Aktivität in der vorliegenden Arbeit berücksichtigen dagegen die PLN-Phosphorylierung. Die vergleichsweise geringe inhibitorische Wirkung der AFA-PLN-Mutante resultiert dabei aus deren höherer Basal-Phosphorylierung im Vergleich zu Wildtyp-PLN. Beleg dafür ist nicht zuletzt der geringere Anstieg der SERCA2a-Aktivität nach Phosphorylierung von AFA-PLN (11 %) im Vergleich zu Wildtyp-PLN (51 %). In Anwesenheit von Pentameren hatte die  $\beta$ -adrenerge Stimulation somit einen weitaus größeren Effekt auf die Regulation des Kalziumhaushaltes. Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation von TgPLN wie auch von TgAFA-PLN führte zur maximalen SERCA2a-Aktivität, da die Aktivitätsniveaus dem Niveau der SERCA2a-Aktivität der PLN-KO-Mäuse entsprachen.

#### **4.8 Modell der PLN-SERCA2a-Regulation**

Im Vergleich der konzentrations- und zeitabhängigen Phosphorylierungsmuster von PLN-Monomer und Pentamer, der PKA-Co-IP-Versuchen und PLN-SERCA2a-Co-IP-Analysen sowie den SERCA2a-Aktivitätsmessungen zeigten sich PLN-Pentamere (in Wildtyp-PLN; TgPLN) als „Phosphat-Fänger“ zur Abschwächung und Verzögerung der Phosphorylierung von PLN-Monomeren. Diese Funktion hat im Wildtyp-PLN eine Verstärkung der SERCA2a-Inhibition durch PLN-Monomere zur Folge. PKA-abhängige Phosphorylierung kann diese Inhibition vollständig aufheben.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit wird für die PLN-SERCA2a-Regulation das in **Abb. 40** skizzierte Modell postuliert. Die Phosphorylierung der PLN-Pentamere dämpft unter Basal-Bedingungen und bei geringer PKA-Stimulation die Phosphorylierung der Monomere ab. Daraus resultiert eine starke Inhibierung der enzymatischen SERCA2a-Aktivität. Erst bei starker Stimulation der PKA werden auch die PLN-Monomere phosphoryliert und schließlich eine maximale Phosphorylierung erreicht. Die Differenz zwischen maximaler und minimaler inhibitorischer Wirkung des PLN ist somit in Anwesenheit von Pentameren höher. Daraus resultiert für PLN eine größere Vielfalt der Regulationsmöglichkeiten der SERCA2a-Aktivität.



**Abb. 40: Modell der molekularen Pentamer-Funktion.**

Ohne PKA-Stimulation (linke Seite) agieren die PLN-Pentamere als „Phosphat-Fänger“ und garantieren dabei die maximale SERCA2a (grau) –Inhibition durch unphosphorylierte Monomere (rot). Nach PKA-abhängiger Phosphorylierung werden die PLN-Pentamere bevorzugt phosphoryliert (mitte) bis ihre Funktion als „Phosphat-Puffer“ aufgebraucht ist. Erst dann setzt die Phosphorylierung der Monomere ein, was zur Aufhebung der SERCA2a-Inhibition und somit zur Steigerung der SERCA2a-Aktivität führt.

## 5 Zusammenfassung

Phospholamban (PLN) reguliert in der Herzmuskelzelle die Aktivität der Kalzium-ATPase SERCA2a und damit maßgeblich die Kinetik des myozytären Kalzium-Kreislaufs. PLN liegt im Herz in Form von Monomeren und Pentameren vor, wobei angenommen wird, dass nur die Monomere die Aktivität der SERCA2a durch direkte Interaktion hemmen. Die Funktion der Pentamere ist noch immer unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob PLN-Pentamere für die PKA-abhängige Phosphorylierung des PLN und damit für die Regulation der PLN-Aktivität von Bedeutung sein können.

Mit Hilfe transfizierter HEK293AD-Zellen und verschiedener PLN-Mutanten wurde gezeigt, dass sowohl PLN-Monomere als auch -Pentamere durch die PKA phosphoryliert werden, wobei die Phosphorylierung der Monomere in Anwesenheit von Pentameren geringer ist und verzögert abläuft. Ohne Pentamer war die Phosphorylierung der Monomere dagegen bereits basal und nach moderater PKA-Stimulation stärker. Ursache dafür schien eine höhere Affinität der PKA für PLN-Pentamere als für Monomere zu sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht nur PLN-Monomere sondern auch das PLN-Pentamer mit der SERCA2a interagieren und das Oligomer im Gegensatz zum PLN-Monomer nach PLN-Phosphorylierung zu einem kleinen Anteil an die SERCA2a gebunden bleibt. Auch spiegelten sich die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster von PLN-Pentamer und Monomer in den SERCA2a-Aktivitäten wieder. Messungen der SERCA2a-Aktivität in Mäuseherzen mit (Wildtyp und TgPLN) und ohne (TgAFA-PLN) PLN-Pentamere zeigten, dass Wildtyp-PLN und TgPLN die SERCA2a stärker inhibieren als TgAFA-PLN, was auf die stärkere basale Phosphorylierung des TgAFA-PLN zurückzuführen war. Nach PKA-Stimulation war der Anstieg der Enzymaktivität in Anwesenheit von TgPLN fast dreimal höher als in TgAFA-PLN. Analog zeigte TgPLN eine deutlichere Steigerung der Phosphorylierung der PLN-Monomere als TgAFA-PLN.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PLN-Pentamere durch Hemmung der Monomer-Phosphorylierung deren Aktivität erhöhen mit der Folge einer verstärkten Inhibition

der SERCA2a. Da die inhibitorische Wirkung durch PKA-Stimulation vollständig aufgehoben werden kann, erhöhen die Pentamere die Regulationsmöglichkeiten der SERCA2a-Aktivität.

## Summary

Phospholamban (PLN) regulates the activity of the calcium ATPase SERCA2a and thus the kinetics of myocyte calcium cycling. In the heart, PLN occurs in monomeric and pentameric form, however, only monomers are thought to inhibit the activity of SERCA2a by direct interaction. The function of the pentamer is still unclear. The aim of the present work was to investigate whether PLN pentamers may play a role for PKA dependent PLN phosphorylation and thus for regulating PLN activity.

Using transfected HEK293AD cells and various PLN mutants, it was shown that both PLN monomers and pentamers get phosphorylated by PKA. Intriguingly, phosphorylation of monomers was delayed in the presence of pentamers but increased in the absence of pentamers, both under basal conditions and moderate PKA stimulation. The underlying reason for this observation turned out to be a higher affinity of PKA for PLN pentamers compared to monomers. Furthermore, not only PLN monomers but also PLN pentamers interacted with SERCA2a. Unlike monomers, a small proportion of PLN oligomers was still bound to SERCA2a following PLN phosphorylation. Further, SERCA2a activity reflected the different phosphorylation patterns of monomers and pentamers. Measurements of SERCA2a activity in mouse hearts with (Wildtyp-PLN; TgPLN) and without PLN pentamers (TgAFA-PLN) showed that wild-type PLN and TgPLN strongly inhibit SERCA2a due to stronger phosphorylation of TgAFA-PLN. After PKA stimulation, the increase of SERCA2a enzyme activity was almost three times higher in TgPLN than in TgAFA-PLN. Likewise, the increase of monomer phosphorylation was more pronounced in TgPLN than in TgAFA-PLN.

Taken together, it was shown that PLN pentamers increase the activity of PLN monomers by attenuating monomer phosphorylation leading to increased inhibition of SERCA2a. Since this inhibition can be completely abolished by PKA stimulation, we conclude that PLN pentamers augment the regulatory range of SERCA2a.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
CaMKII	Calcium-Kalmodulin abhängige Protein Kinase II
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
dob	Dobutamin
E. coli	Escherichia coli
HEK293AD-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
Ile	Isoleucin
Iso	Isoprenalin
kb	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
KO	Knock out
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m/V	Masse/ Volumen
min	Minute
NADH	Nicotinamid-Adenin-dinukleotid
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
*P	Signifikanzwert ( <i>probability</i> )
PCR	Polymeraseketten ( <i>Chain</i> )-Reaktion
PhosTag™	Phosphat-bindender Zusatz
PKA	Protein-Kinase A

PLN	Phospholamban
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Protein-Phosphatase 1
<i>Primer</i>	DNA-Oligonukleotid
RyR-Rezeptor	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
SERCA2a	<i>sarco endoplasmic calcium ATPase 2a</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TPG	Thapsigargin
V	Volt
V/V	Volumen/ Volumen
Val	Valin
wt	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

Akin, B. L., Z. Chen and L. R. Jones (2010). "Superinhibitory Phospholamban Mutants Compete with Ca<sup>2+</sup> for Binding to SERCA2a by Stabilizing a Unique Nucleotide-dependent Conformational State." *Journal of Biological Chemistry* 285(37): 28540-28552.

Akin, B. L., T. D. Hurley, Z. Chen,*et al.* (2013). "The structural basis for phospholamban inhibition of the calcium pump in sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 288(42): 30181-30191.

Andersson, K. B., J. A. Birkeland, A. V. Finsen,*et al.* (2009). "Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the Serca2 gene." *J Mol Cell Cardiol* 47(2): 180-187.

Arkin, I. T., P. D. Adams, K. R. MacKenzie,*et al.* (1994). "Structural organization of the pentameric transmembrane alpha-helices of phospholamban, a cardiac ion channel." *EMBO J* 13(20): 4757-4764.

Asahi, M., Y. Kimura, K. Kurzydowski,*et al.* (1999). "Transmembrane helix M6 in sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase forms a functional interaction site with phospholamban. Evidence for physical interactions at other sites." *J Biol Chem* 274(46): 32855-32862.

Asahi, M., E. McKenna, K. Kurzydowski,*et al.* (2000). "Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases are dissociated by elevated Ca<sup>2+</sup>, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP." *J Biol Chem* 275(20): 15034-15038.

Baker, D. L., K. Hashimoto, I. L. Grupp,*et al.* (1998). "Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts." *Circ Res* 83(12): 1205-1214.

Bassani, J. W., R. A. Bassani and D. M. Bers (1994). "Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms." *J Physiol* 476(2): 279-293.

Bers, D. M. (2000). "Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction." *Circ Res* 87(4): 275-281.

Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." *Annu Rev Physiol* 70: 23-49.

Bidwell, P., D. J. Blackwell, Z. Hou,*et al.* (2011). "Phospholamban binds with differential affinity to calcium pump conformers." *J Biol Chem* 286(40): 35044-35050.

Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* 7(8): 2745-2752.

Chen, Z., B. L. Akin and L. R. Jones (2010). "Ca<sup>2+</sup> Binding to Site I of the Cardiac Ca<sup>2+</sup> Pump Is Sufficient to Dissociate Phospholamban." *Journal of Biological Chemistry* 285(5): 3253-3260.

Chen, Z., B. L. Akin, D. L. Stokes,*et al.* (2006). "Cross-linking of C-terminal residues of phospholamban to the Ca<sup>2+</sup> pump of cardiac sarcoplasmic reticulum to probe spatial and functional interactions within the transmembrane domain." *J Biol Chem* 281(20): 14163-14172.

Chen, Z., D. L. Stokes, W. J. Rice,*et al.* (2003). "Spatial and dynamic interactions between phospholamban and the canine cardiac Ca<sup>2+</sup> pump revealed with use of heterobifunctional cross-linking agents." *J Biol Chem* 278(48): 48348-48356.

Chiesi, M. and R. Schwaller (1989). "Involvement of electrostatic phenomena in phospholamban-induced stimulation of Ca uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum." *FEBS Lett* 244(1): 241-244.

Chu, A., M. C. Dixon, A. Saito,*et al.* (1988). "Isolation of sarcoplasmic reticulum fractions referable to longitudinal tubules and functional terminal cisternae from rabbit skeletal muscle", *Methods in Enzymology*. 157: 36-46.

Chu, G., J. W. Lester, K. B. Young,*et al.* (2000). "A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists." *J Biol Chem* 275(49): 38938-38943.

Chu, G., L. Li, Y. Sato,*et al.* (1998). "Pentameric assembly of phospholamban facilitates inhibition of cardiac function in vivo." *J Biol Chem* 273(50): 33674-33680.

Cohen, P. (1989). "The structure and regulation of protein phosphatases." *Annu Rev Biochem* 58: 453-508.

Cornea, R. L., J. M. Autry, Z. Chen,*et al.* (2000). "Reexamination of the role of the leucine/isoleucine zipper residues of phospholamban in inhibition of the Ca<sup>2+</sup> pump of cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 275(52): 41487-41494.

Cornea, R. L., L. R. Jones, J. M. Autry,*et al.* (1997). "Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers." *Biochemistry* 36(10): 2960-2967.

Daly, J. W. (1984). "Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview." *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17: 81-89.

Dong, X. and D. D. Thomas (2014). "Time-resolved FRET reveals the structural mechanism of SERCA-PLB regulation." *Biochem Biophys Res Commun* 449(2): 196-201.

Edes, I. and E. G. Kranias (1990). "Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts." *Circ Res* 67(2): 394-400.

Fearnley, C. J., H. L. Roderick and M. D. Bootman (2011). "Calcium signaling in cardiac myocytes." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(11): a004242.

Fujii, J., K. Maruyama, M. Tada,*et al.* (1989). "Expression and site-specific mutagenesis of phospholamban. Studies of residues involved in phosphorylation and pentamer formation." *J Biol Chem* 264(22): 12950-12955.

Fujii, J., A. Ueno, K. Kitano,*et al.* (1987). "Complete complementary DNA-derived amino acid sequence of canine cardiac phospholamban." *J Clin Invest* 79(1): 301-304.

Glaves, J. P., C. A. Trieber, D. K. Ceholski,*et al.* (2011). "Phosphorylation and Mutation of Phospholamban Alter Physical Interactions With the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump." *Journal of Molecular Biology* 405(3): 707-723.

Gruber, S. J., S. Haydon and D. D. Thomas (2012). "Phospholamban mutants compete with wild type for SERCA binding in living cells." *Biochem Biophys Res Commun* 420(2): 236-240.

Gustavsson, M., N. J. Traaseth, C. B. Karim,*et al.* (2011). "Lipid-mediated folding/unfolding of phospholamban as a regulatory mechanism for the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase." *J Mol Biol* 408(4): 755-765.

Ha, K. N., L. R. Masterson, Z. Hou,*et al.* (2011). "Lethal Arg9Cys phospholamban mutation hinders Ca<sup>2+</sup>-ATPase regulation and phosphorylation by protein kinase A." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 2735-2740.

Hagemann, D. and R. P. Xiao (2002). "Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart." *Trends Cardiovasc Med* 12(2): 51-56.

He, H., F. J. Giordano, R. Hilal-Dandan,*et al.* (1997). "Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation." *J Clin Invest* 100(2): 380-389.

Hoshijima, M., Y. Ikeda, Y. Iwanaga,*et al.* (2002). "Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery." *Nat Med* 8(8): 864-871.

James, P., M. Inui, M. Tada,*et al.* (1989). "Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum." *Nature* 342(6245): 90-92.

James, Z. M., J. E. McCaffrey, K. D. Torgersen,*et al.* (2012). "Protein-protein interactions in calcium transport regulation probed by saturation transfer electron paramagnetic resonance." *Biophys J* 103(6): 1370-1378.

Ji, Y., M. J. Lalli, G. J. Babu,*et al.* (2000). "Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cardiomyocyte function." *J Biol Chem* 275(48): 38073-38080.

Jones, L. R., R. L. Cornea and Z. Chen (2002). "Close proximity between residue 30 of phospholamban and cysteine 318 of the cardiac Ca<sup>2+</sup> pump revealed by intermolecular thiol cross-linking." *J Biol Chem* 277(31): 28319-28329.

Jones, L. R., H. K. Simmerman, W. W. Wilson,*et al.* (1985). "Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 260(12): 7721-7730.

Karim, C. B., C. G. Marquardt, J. D. Stamm,*et al.* (2000). "Synthetic null-cysteine phospholamban analogue and the corresponding transmembrane domain inhibit the Ca-ATPase." *Biochemistry* 39(35): 10892-10897.

Karim, C. B., Z. Zhang, E. C. Howard,*et al.* (2006). "Phosphorylation-dependent conformational switch in spin-labeled phospholamban bound to SERCA." *J Mol Biol* 358(4): 1032-1040.

Karjalainen, E. L., K. Hauser and A. Barth (2007). "Proton paths in the sarcoplasmic reticulum Ca(2+) -ATPase." *Biochim Biophys Acta* 1767(11): 1310-1318.

Kim, H. W., N. A. Steenaart, D. G. Ferguson,*et al.* (1990). "Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles." *J Biol Chem* 265(3): 1702-1709.

Kimura, Y., M. Asahi, K. Kurzydowski,*et al.* (1998). "Phospholamban domain Ib mutations influence functional interactions with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform of cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 273(23): 14238-14241.

Kimura, Y., K. Kurzydowski, M. Tada,*et al.* (1996). "Phospholamban regulates the Ca<sup>2+</sup>-ATPase through intramembrane interactions." *J Biol Chem* 271(36): 21726-21731.

Kimura, Y., K. Kurzydowski, M. Tada,*et al.* (1997). "Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization." *J Biol Chem* 272(24): 15061-15064.

Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta and T. Koike (2012). Phos-tag Affinity Electrophoresis for Protein Kinase Profiling. *Protein Kinase Technologies*. H. Mukai, Humana Press. 68: 13-34.

Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, *et al.* (2006). "Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins." *Mol Cell Proteomics* 5(4): 749-757.

Kranias, E. G. and R. J. Hajjar (2012). "Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulator." *Circ Res*. 110(12): 1646-1660.

Kuhlbrandt, W. (2004). "Biology, structure and mechanism of P-type ATPases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 282-295.

Kuschel, M., P. Karczewski, P. Hempel, *et al.* (1999). "Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the  $\beta$ -adrenergic regulation of cardiac relaxation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 276(5): H1625-H1633.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Le Peuch, C. J., J. Haiech and J. G. Demaille (1979). "Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations." *Biochemistry* 18(23): 5150-5157.

Lohse, M. J., S. Engelhardt and T. Eschenhagen (2003). "What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?" *Circ Res* 93(10): 896-906.

Luo, W., I. L. Grupp, J. Harrer, *et al.* (1994). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation." *Circ Res* 75(3): 401-409.

Lytton, J., M. Westlin and M. R. Hanley (1991). "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." *J Biol Chem* 266(26): 17067-17071.

MacLennan, D. H., M. Abu-Abed and C. Kang (2002). "Structure-function relationships in Ca(2+) cycling proteins." *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 897-918.

MacLennan, D. H. and N. M. Green (2000). "Structural biology. Pumping ions." *Nature* 405(6787): 633-634.

MacLennan, D. H., Y. Kimura and T. Toyofuku (1998). "Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban." *Ann N Y Acad Sci* 853: 31-42.

MacLennan, D. H. and E. G. Kranias (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 566-577.

Maffeo, C. and A. Aksimentiev (2009). "Structure, dynamics, and ion conductance of the phospholamban pentamer." *Biophys J* 96(12): 4853-4865.

Masterson, L. R., T. Yu, L. Shi,*et al.* (2011). "cAMP-dependent protein kinase A selects the excited state of the membrane substrate phospholamban." *J Mol Biol* 412(2): 155-164.

Mattiazzi, A., C. Mundiña-Weilenmann, C. Guoxiang,*et al.* (2005). "Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions." *Cardiovasc Res* 68(3): 366-375.

Morita, T., D. Hussain, M. Asahi,*et al.* (2008). "Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase." *Biochem Biophys Res Commun* 369(1): 188-194.

Mueller, B., C. B. Karim, I. V. Negrashov,*et al.* (2004). "Direct detection of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase interaction in membranes using fluorescence resonance energy transfer." *Biochemistry* 43(27): 8754-8765.

Münch, G., B. Bölck, P. Karczewski,*et al.* (2002). "Evidence for Calcineurin-mediated Regulation of SERCA 2a Activity in Human Myocardium." *J Mol Cell Cardiol.* 34(3): 321-334.

Mundiña-Weilenmann, C., L. Vittone, M. Ortale,*et al.* (1996). "Immunodetection of Phosphorylation Sites Gives New Insights into the Mechanisms Underlying Phospholamban Phosphorylation in the Intact Heart." *J Biol Chem.* 271(52): 33561-33567.

Mundina de Weilenmann, C., L. Vittone, G. de Cingolani,*et al.* (1987). "Dissociation between contraction and relaxation: the possible role of phospholamban phosphorylation." *Basic Res Cardiol* 82(6): 507-516.

Oxenoid, K. and J. J. Chou (2005). "The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): 10870-10875.

Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." *Muscle Nerve* 35(4): 430-442.

Periasamy, M., T. D. Reed, L. H. Liu,*et al.* (1999). "Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene." *J Biol Chem* 274(4): 2556-2562.

Reddy, L. G., L. R. Jones and D. D. Thomas (1999). "Depolymerization of Phospholamban in the Presence of Calcium Pump: A Fluorescence Energy Transfer Study†." *Biochemistry* 38(13): 3954-3962.

Robia, S. L., K. S. Campbell, E. M. Kelly, *et al.* (2007). "Förster Transfer Recovery Reveals That Phospholamban Exchanges Slowly From Pentamers but Rapidly From the SERCA Regulatory Complex." *Circulation Research* 101(11): 1123-1129.

Robia, S. L., N. C. Flohr and D. D. Thomas (2005). "Phospholamban pentamer quaternary conformation determined by in-gel fluorescence anisotropy." *Biochemistry* 44(11): 4302-4311.

Schultz Jel, J., B. J. Glascock, S. A. Witt, *et al.* (2004). "Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3): H1146-1153.

Seidel, K., O. C. Andronesi, J. Krebs, *et al.* (2008). "Structural characterization of Ca(2+)-ATPase-bound phospholamban in lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy." *Biochemistry* 47(15): 4369-4376.

Shannon, T. R. and D. M. Bers (2004). "Integrated Ca<sup>2+</sup> management in cardiac myocytes." *Ann N Y Acad Sci* 1015: 28-38.

Shareef, M. A., L. A. Anwer and C. Poizat (2014). "Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure." *Eur J Pharmacol* 724: 1-8.

Simmerman, H. K. and L. R. Jones (1998). "Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function." *Physiol Rev* 78(4): 921-947.

Simmerman, H. K., Y. M. Kobayashi, J. M. Autry, *et al.* (1996). "A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure." *J Biol Chem* 271(10): 5941-5946.

Stokes, D. L. and N. M. Green (2003). "Structure and function of the calcium pump." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 445-468.

Stokes, D. L., A. J. Pomfret, W. J. Rice, *et al.* (2006). "Interactions between Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the pentameric form of phospholamban in two-dimensional co-crystals." *Biophys J* 90(11): 4213-4223.

Thastrup, O., P. J. Cullen, B. K. Drøbak, *et al.* (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(7): 2466-2470.

- Toyofuku, T., K. Kurzydowski, M. Tada,*et al.* (1994). "Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 269(4): 3088-3094.
- Toyoshima, C., M. Asahi, Y. Sugita,*et al.* (2003). "Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca<sup>2+</sup> ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2): 467-472.
- Toyoshima, C. and G. Inesi (2004). "Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* 73: 269-292.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomura,*et al.* (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." *Nature* 405(6787): 647-655.
- Traaseth, N. J., K. N. Ha, R. Verardi,*et al.* (2008). "Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca(2+)-ATPase." *Biochemistry* 47(1): 3-13.
- Traaseth, N. J., L. Shi, R. Verardi,*et al.* (2009). "Structure and topology of monomeric phospholamban in lipid membranes determined by a hybrid solution and solid-state NMR approach." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25): 10165-10170.
- Traaseth, N. J. and G. Veglia (2010). "Probing excited states and activation energy for the integral membrane protein phospholamban by NMR CPMG relaxation dispersion experiments." *Biochim Biophys Acta* 1798(2): 77-81.
- Verardi, R., L. Shi, N. J. Traaseth,*et al.* (2011). "Structural topology of phospholamban pentamer in lipid bilayers by a hybrid solution and solid-state NMR method." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(22): 9101-9106.
- Vetter, R., U. Rehfeld, C. Reissfelder,*et al.* (2002). "Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase improves reticular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and diabetic rat hearts." *FASEB J* 16(12): 1657-1659.
- Vittone, L., C. Mundina, G. Chiappe de Cingolani,*et al.* (1990). "cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts." *Am J Physiol.* 258(2): H318-325.
- Vostrikov, V. V., K. R. Mote, R. Verardi,*et al.* (2013). "Structural dynamics and topology of phosphorylated phospholamban homopentamer reveal its role in the regulation of calcium transport." *Structure* 21(12): 2119-2130.
- Wegener, A. D. and L. R. Jones (1984). "Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits." *J Biol Chem.* 259(3): 1834-1841.

Wegener, A. D., H. K. Simmerman, J. Liepnieks,*et al.* (1986). "Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. Generation of a low resolution model of phospholamban structure." *J Biol Chem* 261(11): 5154-5159.

Wegener, A. D., H. K. Simmerman, J. P. Lindemann,*et al.* (1989). "Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation." *J Biol Chem* 264(19): 11468-11474.

Wuytack, F., L. Raeymaekers and L. Missiaen (2002). "Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps." *Cell Calcium* 32(5-6): 279-305.

Zamoon, J., A. Mascioni, D. D. Thomas,*et al.* (2003). "NMR solution structure and topological orientation of monomeric phospholamban in dodecylphosphocholine micelles." *Biophys J* 85(4): 2589-2598.

Zvaritch, E., P. H. Backx, F. Jirik,*et al.* (2000). "The transgenic expression of highly inhibitory monomeric forms of phospholamban in mouse heart impairs cardiac contractility." *J Biol Chem* 275(20): 14985-14991.

## 8 Publikationsverzeichnis

### Zeitschriftenbeiträge

T.Wittmann, Prof. M.J. Lohse, Prof. J.P. Schmitt;  
Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers;  
JMCC (2014) in Revision

### Konferenzbeiträge

März 2011 **Posterpräsentation** auf der 77.Jahrestagung der DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie) in Frankfurt  
Titel: „Generation and Characterization of Phospholamban (PLN) mutants“

März 2012 **Posterpräsentation** auf der 78.Jahrestagung der DGPT in Dresden  
Titel: “Oligomerization is important for Phospholamban (PLN) phosphorylation”

April 2012 **Posterpräsentation** auf der Jahrestagung der DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung) Mannheim, Rosengarten  
Titel: “The activity of the myocyte calcium regulator Phospholamban (PLN) is critically modulated within the pentamer”

März 2013 **Posterpräsentation** auf der 79. Jahrestagung der DGPT in Halle/Saale  
Titel: „The pentameric form of Phospholamban (PLN) is an important PKA target”

Mai 2013 **Vortrag** auf der Tagung der DGK in Mannheim, Rosengarten  
Titel: „Pentameric PLN is a crucial regulator of myocyte calcium cycling by PKA phosphorylation”

Nov. 2013 **Posterpräsentation** auf der internationalen Tagung der American Heart Association in Dallas, Texas, USA  
Titel: „The Phospholamban pentamer is an important PKA target and thus a crucial regulator of myocyte calcium cycling”

## 9 Curriculum Vitae



## 10 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim P. Schmitt bedanken für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Ob direkt vor Ort oder aus der Ferne, Prof. Dr. Schmitt hat sich immer viel Zeit für hilfreiche Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit genommen. Vielen Dank dafür!

Herrn Prof. Dr. Martin J. Lohse danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu dürfen, sowie für seine Unterstützung und Hilfe als einer meiner Betreuer im Komitee der GSLS.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler für Betreuung und hilfreiche Diskussionen während der Treffen im Rahmen der GSLS.

Ein besonders großes Dankeschön geht an Frau Birgit Thur. Sie war meine stetige Unterstützung, meine rechte Hand, mein Motivator und auch meine aufbauende Kraft wenn es mal ungute Phasen gab. Ohne Sie hätte ich viele schöne Stunden im Labor nicht gehabt. Natürlich danke ich auch Frau Dr. Lydia Vlaskin für Ihre große Hilfe im Bereich der Maus-Versuche. Sie hat mir stets mit Rat und Hilfe beigestanden. Auch danke ich der ganzen Arbeitsgruppe von Dr. Leif Hommers, die mich mit offenen Armen aufgenommen haben und mit mir durch Dick und Dünn gegangen sind. Ich danke außerdem allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die stets freundliche und kollegiale Zusammenarbeit. Ein herzliches Dankeschön an alle die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Zum Schluss danke ich natürlich von Herzen meinem Freund Thomas, meiner Mama Marina und dem ganzen Rest meiner Familie für das viele aufgebrachte Verständnis, die Geduld und die grenzenlose Unterstützung über all die Jahre, ohne die diese Arbeit und mein Werdegang sicherlich nicht möglich gewesen wäre.