



**Effekte des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf  $\beta$ -adrenerge  
Signalwege, Herzfunktion und die Entwicklung der Herzinsuffizienz**

**Effects of the Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) on  $\beta$ -adrenergic  
signalling, cardiac function and the development of heart failure**

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

Vorgelegt von  
**Evelyn Schmid**  
aus Singen  
Würzburg 2016



## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Effects of the Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) on  $\beta$ -adrenergic signalling, cardiac function and the development of heart failure“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from 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.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Effekte des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege, Herzfunktion und die Entwicklung der Herzinsuffizienz“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig 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:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Betreuer: Prof. Dr. Kristina Lorenz

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

3. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Schlosser

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	$\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale	1
1.1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.2	$\beta$ -adrenerge Rezeptoren	2
1.1.3	Signaltransduktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren	3
1.1.4	Kinasen der $\beta$ -adrenergen Signalwege	5
1.1.5	Funktionen der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren im Herzen	11
1.2	Regulation $\beta$ -adrenerger Rezeptorsignale	13
1.2.1	Die G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinasen (GRK)	14
1.2.2	Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP)	17
1.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	23
1.3.1	Strukturelle Veränderungen in der Herzinsuffizienz	24
1.3.2	Zelluläre Veränderungen in der Herzinsuffizienz	27
1.3.3	Therapeutische Angriffspunkte	31
1.4	Ziel dieser Arbeit	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1	Material	35
2.1.1	Substanzen	35
2.1.2	Kits	37
2.1.3	Oligonukleotide	37
2.1.4	Antikörper	38
2.1.5	Biologisches Material	39
2.2	Methoden	41
2.2.1	Experimentelle Tiermodelle	41
2.2.2	Zellpräparation und Kultivierung von Primärzellen	44
2.2.3	Untersuchung zellulärer Kaskaden in Kardiomyozyten	46
2.2.4	Methoden zur histologischen Untersuchung von Herzgewebe	47
2.2.5	Analyse des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten	49
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden	49

2.2.7	Bestimmung der Kontraktionsrate in neonatalen Kardiomyozyten	51
2.2.8	Bestimmung des Calcium- <i>Cycling</i> in Kardiomyozyten . . . . .	52
2.2.9	Analyse der cAMP-Akkumulation mittels eines Radio-Immun-Assays (RIA) . . . . .	55
2.2.10	Analyse der Markergenexpression durch rtPCR . . . . .	55
2.2.11	Bestimmung der $\beta$ AR-Expression in isolierten Herzmembranen . .	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>61</b>
3.1	Effekte der RKIP-Expression in neonatalen Kardiomyozyten . . . . .	61
3.2	Effekte der RKIP-Expression in transgenen Mäusen . . . . .	65
3.3	Effekte der RKIP-Expression unter Aktivierung der $\beta$ AR mit Isoprenalin	76
3.4	Einfluss des RKIP auf die Kontraktilität in Abhängigkeit des $\beta_1$ AR und $\beta_2$ AR . . . . .	80
3.5	Einfluss von RKIP auf die kardiale Fibrosierung und die Transkription des Herzinsuffizienzmarkers BNP . . . . .	82
3.6	Einfluss des RKIP auf die Umstrukturierung in Abhängigkeit des $\beta_1$ AR und $\beta_2$ AR . . . . .	86
3.7	Einfluss von RKIP auf die Häufigkeit von Extrasystolen . . . . .	88
3.8	Effekte des RKIP auf die Ryanodin-Rezeptor und L-Typ-Calciumkanal -Phosphorylierung . . . . .	91
3.9	Untersuchung einer AAV-vermittelten Gentherapie zur Erhöhung der RKIP- Expression in der Herzinsuffizienzentwicklung . . . . .	94
3.9.1	Untersuchungen der funktionellen Veränderungen in der Herzin- suffizienzentwicklung durch die Gentherapie . . . . .	96
3.9.2	Einfluss des RKIP auf das Lungengewicht und die ANF-Expression als Parameter für das Ausmaß der Herzinsuffizienz . . . . .	97
3.9.3	Einfluss von RKIP auf die Entwicklung der interstitiellen Fibrose und der KollagenIII $\alpha$ 1-Expression . . . . .	99
3.10	Einfluss des RKIP auf die Proliferation von Fibroblasten . . . . .	101
3.11	Einfluss des RKIP auf die Art des Herzwachstums . . . . .	102
3.11.1	Einfluss des RKIP auf die SERCA2-Expression als Marker für physiologische Hypertrophie im TAC-Modell . . . . .	103
3.11.2	Einfluss des RKIP auf die Kapillardichte im Myokard . . . . .	104
3.11.3	Einfluss des RKIP auf die Akt-Aktivierung in Abhängigkeit des $\beta_2$ AR . . . . .	105



<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	RKIP als Kinase-Inhibitor	107
4.2	RKIP in $\beta$ -adrenergen Signalwegen	110
4.3	Die RKIP-vermittelten Phänotypen	113
4.4	RKIP als Therapeutikum	118
4.5	Ausblick	120
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>151</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	151
8.2	Pufferzusammensetzungen	153
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>159</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>161</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>163</b>



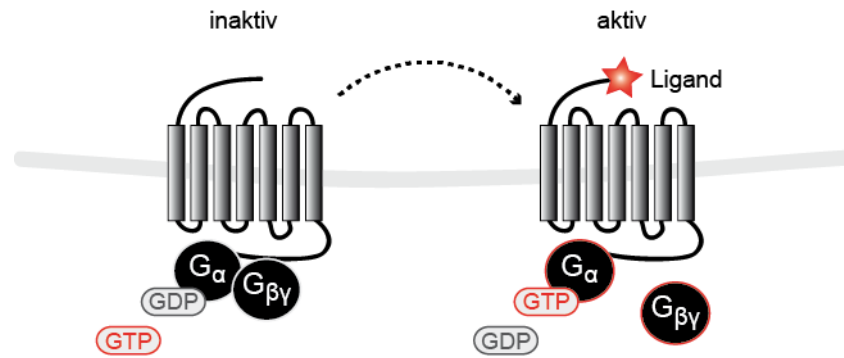
# 1 Einleitung

## 1.1 $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale

### 1.1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Gruppe der Membranrezeptoren dar und sind ubiquitär exprimiert. Sie vermitteln die Regulation von vielen wichtigen physiologischen Effekten und eignen sich daher gut als therapeutische Angriffspunkte. Ihre Struktur ist stark konserviert und charakterisiert durch sieben die Membran durchspannenden  $\alpha$ -Helices, wodurch sie auch als 7-Transmembranrezeptoren oder heptahelikale Rezeptoren bezeichnet werden. Ihr N-Terminus ist in den Extrazellulärraum gerichtet und kann an der Ligandenbindung beteiligt sein. Der C-Terminus ist in das Zytosol gerichtet und bindet Proteine, die die Signalweiterleitung und -vermehrung vermitteln (Bockaert und Pin, 1999). Dabei kann der C-Terminus als Guanin-Nukleotid-Austausch Faktor (GEF) wirken und dadurch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) katalysieren. Als interagierende Proteine sind vor allem die Namengebenden heterotrimeren Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) zu nennen. Es gibt drei Untereinheiten,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  die mit der Zellmembran assoziiert sind. Im inaktiven Zustand ist  $G\alpha$  an GDP gebunden. Wird der Rezeptor aktiviert, induziert dessen Konformationsänderung eine über den vom C-Terminus vermittelten Austausch von GDP zu GTP und bewirkt damit die Aktivierung und Dissoziation von dem Rezeptor,  $G\alpha$ -Protein und  $G\beta\gamma$ -Komplex. Nachfolgende Signalwege können so durch die G-Proteine aktiviert oder inhibiert werden. Die Signalkaskaden von GPCR verlaufen über eine Reihe sehr unterschiedlicher Effektoren. Dazu zählen z.B. Ionenkanäle, Proteinkinasen und -phosphatasen sowie sekundäre Botenstoffe wie Ionen und zyklische Nukleotide. Die Hydrolyse des GTP führt zur Inaktivierung des G-Proteins wodurch  $G\alpha$  und der  $G\beta\gamma$ -Komplex wieder assoziieren und eine erneute Aktivierung durch einen Rezeptor möglich wird (Neer und Clapham, 1988; Oldham und Hamm, 2006). Die Aktivierung eines GPCR ist in Abbildung 1.1 exemplarisch dargestellt.

Es gibt verschiedene G-Proteine, wodurch es den Rezeptoren möglich ist unterschiedliche Signalwege zu aktivieren. Es sind zwanzig  $G\alpha$ -, sieben  $G\beta$ - und elf  $G\gamma$ -Untereinheiten



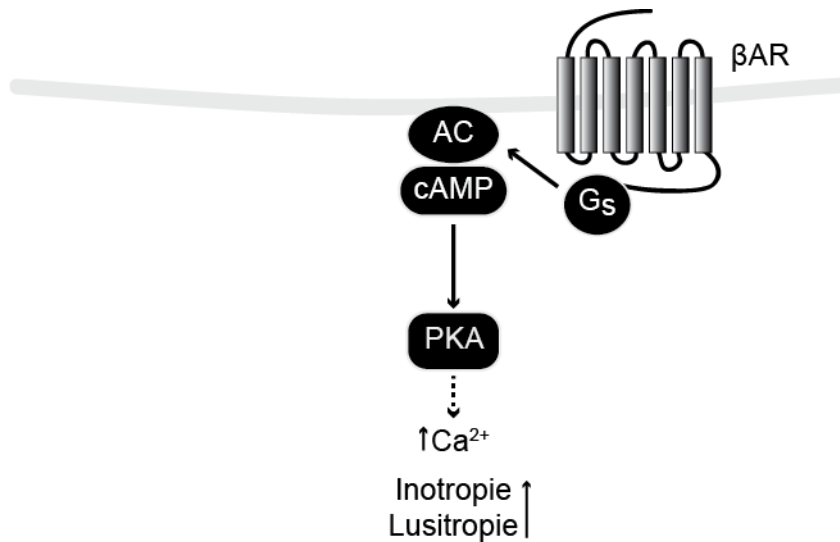
**Abbildung 1.1:** Aktivierung von GPCR und deren G-Proteinen. Der linke Rezeptor stellt einen ruhenden Rezeptor ohne Liganden dar. Die G-Proteine sind gebunden und liegen in ihrer GDP gebundenen und damit inaktiven Form vor. Der rechte Rezeptor wurde durch einen Liganden (roter Stern) aktiviert. Dieses führt zum Austausch von GDP zu GTP und damit zur Aktivierung der G-Proteine (rote Umrandung). **GDP** Guanosindiphosphat; **GTP** Guanosintriphosphat.

bekannt (Neves et al., 2002). Dabei sind die  $G_\alpha$ -Untereinheiten von besonderer Bedeutung, da sie auf Basis von Ähnlichkeiten in ihren Sequenzen in vier Klassen ( $G_{\alpha_{i/0}}$ ,  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_q}$  und  $G_{\alpha_{12/13}}$ ) eingeteilt werden (Huang und Tesmer, 2011) und für die vom Rezeptor vermittelte Signalkaskade von maßgeblicher Bedeutung sind. Sie ermöglichen eine Weiterleitung und Vermehrung von extrazellulären Signalen und bewirken unter anderem Änderungen der Enzymaktivität und des zellulären Genexpressionsprofils, die Reorganisation des Zytoskeletts oder die Depolarisation von Membranen (Simon et al., 1991).

### 1.1.2 $\beta$ -adrenerge Rezeptoren

Das adrenerge System ist Bestandteil des Sympathikus und damit des vegetativen Nervensystems. Der Sympathikus wird in Stresssituationen aktiv, in denen er die „*fight-or-flight*“ Reaktion bewirkt, die sich durch eine gesteigerte Herzrhythmickeit und Muskeltonus, sowie die Steigerung der Glykolyse in Anpassung an einen gesteigerten Energiebedarf, höheren Blutdruck und eine verbesserte Durchblutung auszeichnet. Die Gruppe der adrenergen Rezeptoren, die diese Prozesse steuern, werden durch Katecholamine aktiviert, welche in der Nebenniere und im Nervensystem synthetisiert werden. Zur Gruppe der Katecholamine gehören unter anderem endogene Hormone, wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, aber auch synthetische Stoffe, wie zum Beispiel Isoproterenol. Die adrenergen Rezeptoren sind GPCR der Klasse A und damit den Rhodopsinrezeptoren ähnlich. Kennzeichen dieser Rezeptorklasse sind einige konservierte Motive, wie das DRY-Motiv in der 3. Transmembrandomäne oder einige Palmitoylierungsstellen am C-Terminus. Die adrenergen Rezeptoren werden unterteilt in  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ( $\alpha$ AR,  $\beta$ AR).

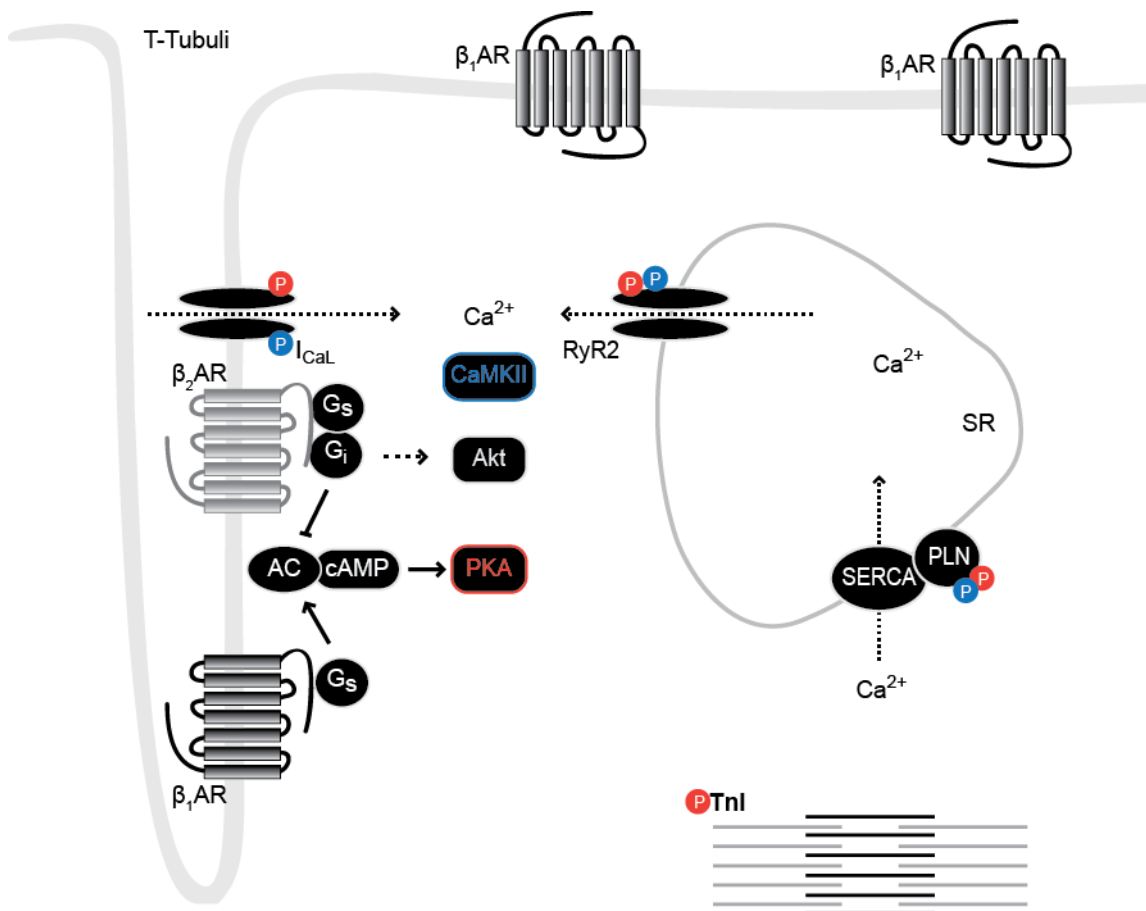
### 1.1.3 Signaltransduktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren



**Abbildung 1.2:** Signaltransduktion der  $\beta$ AR. Dargestellt ist die Kopplung der  $\beta$ AR an die  $G_{\alpha_s}$ -Untereinheit mit nachfolgender Signalkaskade über AC-cAMP-PKA und indirekt zur gesteigerten Calciumfreisetzung. **AC** Adenylylcyclase; **cAMP** zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA** cAMP abhängige Protein Kinase A.

Es gibt drei  $\beta$ AR Subtypen ( $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR,  $\beta_3$ AR), die verschiedene Effekte in unterschiedlichen Organen vermitteln. Die Signalwege, durch die diese Effekte vermittelt werden, verlaufen hauptsächlich über die aktivierenden  $G_{\alpha_s}$ -Untereinheiten. Die Gruppe der  $G_{\alpha_s}$  sind in der Lage, die Adenylylcyclase (AC) zu stimulieren. Durch sie kann Adenosinriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt werden. Das cAMP ist ein sekundärer Botenstoff, der wiederum verschiedene Signalwege aktivieren kann. Die am besten untersuchte Signalkaskade ist dabei die Aktivierung der cAMP abhängigen Protein Kinase A (PKA) (R. P. Xiao, 2000). Neben PKA kann das cAMP über einen Nukleotidaustauschfaktor namens Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*) weitere Signalkaskaden aktivieren (de Rooij et al., 1998; de Rooij et al., 2000) oder auch direkt die Offenwahrscheinlichkeit von HCN-Kanälen (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel*) erhöhen, was in den Schrittmacherzellen des Herzens zum Beispiel eine Erhöhung der Herzfrequenz bewirkt (Biel et al., 2002). Die PKA phosphoryliert einige kontraktile sowie Calcium-transportierende Proteine, die an der elektromechanischen Kopplung in der Herzzelle beteiligt sind. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials öffnet der spannungsgesteuerte L-Typ-Calciumkanal (LTCC) und verursacht damit einen Einstrom von Calcium in das Zytosol. Durch diese Erhöhung des Calciumspiegels wird der Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) aktiviert (Calcium-induzierter

Calciumausstrom). Dieser ist ein Calcium-abhängiger Calciumkanal, der in der Membran des intrazellulären Calciumspeichers, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), lokalisiert ist. Durch seine Öffnung wird der Calciumgehalt im Zytosol weiter erhöht, sodass es durch Bindung an Troponin I und C eine Konformationsänderung der Troponine bewirkt, die wiederum die Bindung der Myosinfilamente an die Aktinfilamente ermöglicht und somit zur Kontraktion der Herzmuskelzelle führt. Die nachfolgende Diastole ist durch die Rückführung des Calciums aus dem Zytosol zurück in das SR und den Extrazellulärraum geprägt. Diese Aufgabe wird durch zwei Transporter, der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA2) und den membranständigen Natrium-Calciumaustauscher (NCX), ermöglicht. Dabei ist die SERCA2 für den Rücktransport in das SR zuständig und der NCX befördert das Calcium in den Extrazellulärraum. Die PKA hat in diesem Kontraktionszyklus mehrere Angriffspunkte, die die Kontraktionskraft und die Relaxationsgeschwindigkeit verstärken (Rababa'h et al., 2015). Durch eine Phosphorylierung des LTCC wird die Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals und somit der Calciumeinstrom erhöht (Bünemann et al., 1999; Gerhardstein et al., 1999). Gleichzeitig kann der Einstrom in das Zytosol auch über die Phosphorylierung des RyR2 vermehrt werden (Reiken et al., 2003). Der erhöhte Calciumspiegel hat eine verstärkte Kontraktion zur Folge (= positiv inotrop). Durch eine PKA-Phosphorylierung am Troponin I wird zudem über eine Verringerung der Calciumsensibilität eine beschleunigte Relaxation bewerkstelligt (Sulakhe und Vo, 1995). Der Relaxationsvorgang wird ferner durch eine Phosphorylierung des Phospholambans (PLN) beschleunigt (Sulakhe und Vo, 1995; Simmerman und Jones, 1998). Das PLN liegt während der Systole an die SERCA2 gebunden vor und hemmt diese somit. Durch die Phosphorylierung wird die Hemmung aufgehoben, was den Rücktransport in das SR verbessert und so die Relaxation beschleunigt (= positiv lusitrop). Neben den  $G\alpha$ -Untereinheiten werden auch durch die  $G\beta\gamma$  der verschiedenen G-Protein Klassen eigene Signalwege aktiviert (Smrcka, 2008). So ist z.B. der  $G\beta\gamma$ -Komplex des  $\beta_2/G\alpha_i$  in der Lage über die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Akt (auch Protein Kinase B/ PKB genannt) zu aktivieren (Stephens et al., 1994). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ - und Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII), die unter anderem von dem  $G\beta\gamma$ -Komplex,  $\beta$ -Arrestin und Epac verursacht werden kann. Auch die Phospholipase  $C\beta$  und damit die Protein Kinase C kann durch  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert werden (Boyer et al., 1992; Camps et al., 1992; Park et al., 1993).



**Abbildung 1.3:** βAR Signalwege in einem Kardiomyozyten. Dargestellt die Verteilung der βAR über die Kardiomyozytenmembran und die Aktivierung verschiedener Kinasen durch βAR in den T-Tubuli. Rote Phosphorylierungen stellen Angriffspunkte der PKA dar und blaue Angriffspunkte der CaMKII. **I<sub>CaL</sub>** L-Typ-Calciumkanal; **RyR2** Ryanodin-Rezeptor 2; **CaMKII** Ca<sup>2+</sup>- und Calmodulin-abhängige Kinase II; **Akt** Akt/PKB; **SR** sarkoplasmatisches Retikulum **AC** Adenylylcyclase; **cAMP** zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA** cAMP abhängige Protein Kinase A; **SERCA2** sarkoplasmatische Calcium-ATPase; **PLN** Phospholamban; **TnI** Troponin I.

#### 1.1.4 Kinasen der β-adrenergen Signalwege

Wie oben beschrieben verlaufen die β-adrenergen Signalwege über viele verschiedene Kinasen. Welche Kinasen aktiviert werden, wird meist über die Art und Dauer des Stimulus entschieden. Dies ermöglicht einem Rezeptor die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, über die verschiedene physiologische Antworten vermittelt werden können. Von besonderer Bedeutung in der β-adrenergen Signaltransduktion sind unter anderen die Kinasen der AGC-Klasse. Sie sind nach ihren prominentesten Mitgliedern benannt: PKA, PKG und PKC und bilden eine Gruppe von Serin/Threonin Kinasen, die von sekundären Botenstoffen wie z.B. cAMP, cGMP oder Lipiden sowie Calcium aktiviert

werden können (Pearce et al., 2010). Im Folgenden wird auf einige Kinasen im Detail eingegangen:

- die PKA, reguliert die Kontraktilität,
- die Akt/PKB, nimmt Einfluss auf den Metabolismus und Zellüberleben,
- die PKC reguliert die Migration und Zellproliferation,
- die GRK, ist hauptverantwortlich für die Desensibilisierung der  $\beta$ AR.

Des Weiteren soll näher auf die CaMKII eingegangen werden, da auch sie in der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion aktiviert wird und einen Anteil an den pathologischen Effekten der  $\beta$ -adrenergen Signalwege hat (Engelhardt et al., 1999; Bisognano et al., 2000).

### Die Protein Kinase A

Die PKA ist eine Serin/Threonin Kinase. Das Phosphorylierungsmotiv ist durch eine basische Aminosäure wie Arginin und Lysin im Abstand von zwei Aminosäuren vor dem Serin oder Threonin charakterisiert (Arg-X-Ser/Thr; Arg-Arg/Lys-X-Ser/Thr). Sie ist ein Heterotetramer aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Von den regulatorischen existieren vier verschiedene Isoformen (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) und von den katalytischen drei (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ ) (Taylor et al., 1990; Beebe et al., 1990; Pearce et al., 2010). Die RII $\alpha$ -Isoform ist im Herzen am höchsten exprimiert, zusätzlich kann auch die RI $\alpha$  gefunden werden (Skalhegg und Tasken, 2000). Im basalen Zustand inhibieren die regulatorischen Untereinheiten die katalytischen. Nach Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten (dabei binden je zwei cAMP an jede RII $\alpha$ ) kommt es zur Konformationsänderung, sodass die regulatorischen von den katalytischen Untereinheiten abdissoziieren. Dies ermöglicht der katalytischen Untereinheit die Übertragung von  $\gamma$ -ATP auf ihre Substrate (Scott, 1991). Wie in dem vorigen Kapitel beschrieben ist die PKA in die Beschleunigung der elektromechanischen Kopplung involviert. Dies erreicht sie, in dem sie Substrate wie Phospholamban (PLN, Serin 16), Troponin I (TnI, Serin 24/Serin 25), das kardiale Myosin-bindende Protein C (cMyBPC), den L-Typ-Calciumkanal (LTCC, Ca<sub>v</sub>1.2 Serin 1928) oder den Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2, Serin 2808 und 2830) phosphoryliert (Solaro et al., 1976; Yoshida et al., 1992). Die PKA besitzt auch Angriffspunkte abseits der elektromechanischen Kopplung. So nimmt sie über den Inhibitor-1 (I-1, Threonin 35) hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Protein Phosphatase 1 (PP1) (Wittköpper et al., 2011). Über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB



(„*cAMP responsive element-binding protein*“, Serin 133) kann die PKA die Transkription beeinflussen. CREB ist an der Aufrechterhaltung der Funktion und Struktur beteiligt und beeinflusst Proliferation, Differenzierung, Anpassungsmechanismen und das Überleben (Ichiki, 2006).

Die Bedeutung der PKA für das Herz war lange umstritten. Neben den schon genannten Funktionen wird sie zusätzlich für Umstrukturierung (= „*remodelling*“) während der Entstehung einer Herzinsuffizienz verantwortlich gemacht. Zu diesen Mechanismen zählt das Größenwachstum (= Hypertrophie) und Absterben (= Apoptose) von Kardiomyozyten sowie die Vernarbung (= Fibrosierung) des Herzmuskels. Dieser Zusammenhang wurde in Versuchen entdeckt, bei denen die prokontraktile Eigenschaften der PKA ausgenutzt werden sollten, indem eine konstitutiv aktive katalytische Untereinheit im Herzen überexprimiert wurde. Die konstitutive Aktivität hatte die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und den plötzlichen Herztod zur Folge (Antos et al., 2001). Diese Ergebnisse führten zu der Meinung, dass die Aktivierung der PKA zu den maladaptiven Veränderungen im Herzen führt, die auch bei Überexpression des  $\beta_1$ AR oder chronischer Stimulation mit Isoprenalin beobachtet wurden (Hasenfuss et al., 1996; Engelhardt et al., 1999; Bisognano et al., 2000; Sucharov et al., 2006). Im weiteren Fortschritt dieses Forschungsgebiets konnte gezeigt werden, dass die PKA eher an der spontanen Aktivierung der  $\beta$ AR beteiligt ist und die frühen Umbauprozesse beeinflusst und zusätzlich auch protektive Signale für das Herz vermittelt. In diesem Zusammenhang gewann eine andere Kinase, die  $\beta$ -adrenerge Signale vermittelt, vor allem für die chronische Aktivierung der Rezeptoren an Bedeutung (Wang et al., 2004; R. Zhang et al., 2005; Grimm und Brown, 2010; Backs et al., 2011; Fischer et al., 2013). Diese Kinase ist die CaMKII und wird im Folgenden im Detail beschrieben.

## Die $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Kinase II

Die CaMKII ist eine Serin/Threonin Kinase, deren Phosphorylierungsmotiv ein Arginin im Abstand von zwei Aminosäuren zum zu phosphorylierenden Serin/Threonin benötigt (Arg-X-X-Ser/Thr). Es gibt vier Isoformen der CaMKII ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) und von diesen gibt es mehrere Splicevarianten. Im Herzen sind vor allem die CaMKII $\gamma$  und CaMKII $\delta$  exprimiert (Anderson et al., 2011). Die einzelnen CaMKII-Einheiten bilden Oligomere aus insgesamt zwölf Untereinheiten und formen dabei zwei katalytische Ringe aus sechs Untereinheiten. Jede Untereinheit besteht aus einem katalytischen, einem regulatorischen und einem autoinhibitorischen Teil. In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin ist der katalytische Teil durch Bindung des autoinhibitorischen Teils von den Substra-

ten abgeschirmt. Nach Bindung der beiden Kofaktoren (ein Calmodulin und vier  $\text{Ca}^{2+}$ ) wird diese Inhibition durch eine Konformationsänderung aufgehoben. Eine Autophosphorylierung an Threonin 286 stabilisiert diese Konformation, wodurch der katalytische Teil weiter in der Lage ist Substrate zu phosphorylieren (Meyer et al., 1992; Anderson et al., 2011; Erickson, 2014). Die genaue Signalkaskade, die zur Aktivierung der CaMKII führt, war lange ungeklärt. In den letzten Jahren konnte man zeigen, dass es Signalwege gibt, die unabhängig von der elektromechanischen Kopplung und auch unabhängig von der PKA zu einem Anstieg von Calcium führen und die CaMKII aktivieren können. Diese Signalwege werden vor allem durch den  $\beta_1\text{AR}$  induziert. Die steigende cAMP-Konzentration aktiviert dabei nicht die PKA sondern Epac („*exchange protein directly activated by cAMP*“), welches entweder in einem Komplex mit  $\beta$ -Arrestin zu einer Aktivierung führt (Mangmool et al., 2010) oder über die Signalkaskade von Epac-Rab2B-PLC $\epsilon$ -PKC zur Calciumausschüttung und CaMKII-Aktivierung führt (Schmidt et al., 2001; Pereira et al., 2007; Métrich et al., 2008; Oestreich et al., 2009). Dabei zieht eine Aktivierung die Phosphorylierung verschiedener Substrate nach sich. Wie in Abbildung 1.3 zu sehen überschneiden sich die Zielproteine der CaMKII und PKA. So kann auch die CaMKII den LTCC ( $\text{Ca}_v\beta_2$  Threonin 498) (Grueter et al., 2008), den RyR2 (Serin 2814) (Currie et al., 2004) und das PLN (Threonin 17) (Wegener et al., 1989; Simmerman und Jones, 1998) phosphorylieren. Zusätzlich vermittelt die CaMKII Effekte über die Phosphorylierung von Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse II. Darunter fallen HDAC4 und HDAC5. Diese HDACs inhibieren eigentlich den Transkriptionsfaktor Mef-2 („*myocyte enhancer factor*“), sodass die CaMKII über diesen Weg die Transkription eines fetalen Genprogramms aktivieren kann (T. Zhang et al., 2003; T. Zhang et al., 2007). Bei der Untersuchung von transgenen Tiermodellen sowie Krankheitsmodellen fiel auf, dass die CaMKII im Verlauf der Hypertrophie- und Herzinsuffizienzentwicklung verstärkt aktiviert wird (Colomer et al., 2003; T. Zhang et al., 2003). Die herzspezifische Erhöhung der Expression führte zu der spontanen Entwicklung von Herzinsuffizienz, Arrhythmien und plötzlichem Herztod. Dieses deutet daraufhin, dass die CaMKII eine bedeutende Rolle in den pathophysiologischen Prozessen der Herzinsuffizienzentwicklung hat (T. Zhang et al., 2002; T. Zhang et al., 2003; Sag et al., 2009). *Knockout*-Studien bestätigten diese Rolle und zeigten eine Abhängigkeit der stattfindenden Umstrukturierung von der CaMKII. Bei Fehlen der CaMKII $\delta$  wurde die Entwicklung der Herzinsuffizienz, die durch Verengung der Aorta und damit einhergehende Nachlasterhöhung induziert wird („*transverse aortic constriction*“ = TAC-Modell), verhindert (Backs et al., 2009; Ling et al., 2009). Eine Deletion der CaMKII $\gamma$  verringerte die Apoptose in Antwort auf

ER-Stress (Timmins et al., 2009). Die Untersuchung einer CaMKII-Inhibition erfolgte durch ein Peptid, das eine kurze Sequenz des regulatorischen Teils beinhaltet und die Kinaseaktivität somit verhindert. Die Expression dieses Peptids führte in Hypertrophie-Modellen, mit chronischer Applikation von Isoproterenol oder Angiotensin oder nach Induktion eines Myokardinfarkts, zu ähnlichen Ergebnissen (R. Zhang et al., 2005; Erickson et al., 2008). Die Inhibition der CaMKII kann die maladaptiven Umbauprozesse in diesen Krankheitsmodellen verringern. Diese Ergebnisse legen nahe, dass  $\beta$ AR induzierte pathophysiologische Veränderungen von der CaMKII vermittelt werden.

## Die Akt/Protein Kinase B

Auch die Akt ist eine Serin/Threonin Kinase. Es kommen drei Isoformen in Säugerzellen vor: Akt1, Akt2 und Akt3. Die drei Isoformen stehen in enger Beziehung zueinander und vermitteln ähnliche Signalwege. Im Herzen sind vor allem die Akt1 und Akt2 exprimiert. Die Aktivierung erfolgt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat) zu PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) katalysiert. Infolge dessen werden die Akt und die Phosphatidylinositol-3-abhängige Kinase (PDK) mittels Bindung der enthaltenen Pleckstrin-homologen Domänen an das PIP<sub>3</sub> an die Membran rekrutiert und in unmittelbare Nähe gebracht. Die konstitutiv aktive PDK kann so die Akt an Serin 473 und Tyrosin 308 phosphorylieren und aktivieren (Sussman et al., 2011).

Studien zeigen, dass körperliche Anstrengung eine Erhöhung der Akt-Aktivität in Verbindung mit physiologischem Herzwachstum nach sich zieht (Konhilas et al., 2005). Im Gegenzug nimmt die Aktivität mit Verringerung der Leistungsfähigkeit und dem Umbau des Herzens im Alter ab (Centurione et al., 2002). Die Akt-Aktivität ist dabei stark von dem glykolytischen Metabolismus abhängig. Mit sinkender Glykolyse verringert sich die Akt-Phosphorylierung, was zur Entwicklung von Herzinsuffizienz beitragen kann (Donthi et al., 2004). Dabei zeigten Studien mit chronischer Akt-Aktivierung gegensätzliche Phänotypen. Besonders die Akt1 ist mit dem physiologischen Herzwachstum assoziiert und kann pathologisches Wachstum antagonisieren, während die Akt3 die gegenteiligen Effekte zeigt (Taniyama et al., 2005; Sussman et al., 2011). Zusätzlich zur Hypertrophie und Apoptose beeinflusst die Akt auch die elektromechanische Kopplung. So geht eine Erhöhung der Akt-Expression mit einer Erhöhung der Calciumströme ( $I_{Ca}$ ) und einer erhöhten SERCA2-Expression einher (Condorelli et al., 2002; Kim et al., 2003; Cittadini et al., 2006). Ein Akt-*Knockout* in Mäusen führte zu reduziertem Organwachstum und reduzierter zellulärer Überlebensfähigkeit (Sussman et al., 2011). Zusammenge-

men führten die Untersuchungen zu der allgemein akzeptierten Hypothese, dass die Aktivierung der Akt kardioprotektive Effekte hat (McGowan et al., 2003; Matsui und Rosenzweig, 2005). Eine antiapoptotische Wirkung konnte in Studien mit Ischämie-Reperusionsmodellen (Armstrong, 2004; Bae und L. Zhang, 2005), nach oxidativem Stress (Aikawa00) und unter erhöhter Nachlast (Ceci et al., 2007) gezeigt werden. Die Zielproteine der Akt sind sehr vielfältig. Sie phosphoryliert BAX und BAD der BCL-2-Proteinfamilie und erhält damit die mitochondriale Stabilität (Jamnicki-Abegg et al., 2005; Gustafsson und Gottlieb, 2007). Über die Inaktivierung von *Forkhead* Transkriptionsfaktoren, im besonderen FOXO3a, verhindert es die Expression von FasL und der TRAIL-Gene, die jeweils die Einleitung der Apoptose induzieren können. Ferner verhindert es die Expression von BIM (BCL-2-Proteinfamilie), das seinerseits wie auch schon BAX die mitochondriale Stabilität gefährdet (Gross et al., 2008). Auch die Produktion von Stickstoff-Monoxid (NO) einem sekundären Botenstoff, der für ventrikuläre Relaxation und myokardiale Umbauprozesse verantwortlich ist, wird von der Akt verstärkt. Die von Akt und der eNOS induzierte NO-Produktion gilt als kardioprotektiv (Dimmeler und Zeiher, 2003). Ferner nimmt die Akt Einfluss auf das Calcium-*Cycling* und die daraus resultierende Kontraktilität (Cittadini et al., 2006). Ein weiterer Effektor der Akt ist mTOR („*mechanistic target of Rapamycin*“), eine Kinase, die Proliferation und Wachstum, sowie die Mobilität der Zelle beeinflusst. Diese Signalkaskade scheint einen der Unterschiede von physiologischer und pathologischer Hypertrophie auszumachen (Kemi et al., 2008).

### Die Protein Kinase C

Die PKC ist eine der namengebenden AGC-Kinasen. Sie ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Konsensusmotiv aus basischen Aminosäuren zwei Positionen vor und nach dem zu phosphorylierenden Serin oder Threonin besteht (Arg-Lys-X-Ser/Thr-X-Arg/Lys; bei der PKC $\alpha$ ; Pearce et al., 2010). Die PKCs sind unterteilt in drei Klassen: die klassischen PKC (cPKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), die neuen PKC (nPKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\nu$ ,  $\theta$ ) und die atypischen PKC (aPKC $\zeta$ ,  $\lambda/\tau$ ). Die Klassen unterscheiden sich vor allem in ihrer Struktur und damit in der Art der Aktivierung. Die cPKC werden durch Diacylglycerol (DAG) und Ca<sup>2+</sup> aktiviert. Die nPKC benötigen nur DAG, während bei den aPKC weder Phospholipide noch Ca<sup>2+</sup> nötig sind, sondern eine direkte allosterische Aktivierung durch die Interaktionspartner geschieht (Rosse et al., 2010). Die cPKC und nPKC sind üblicherweise Bestandteil der GPCR-G $\alpha_q$  Signalkaskade. Hier führt die Aktivierung des G $\alpha_q$ -Proteins zur Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)

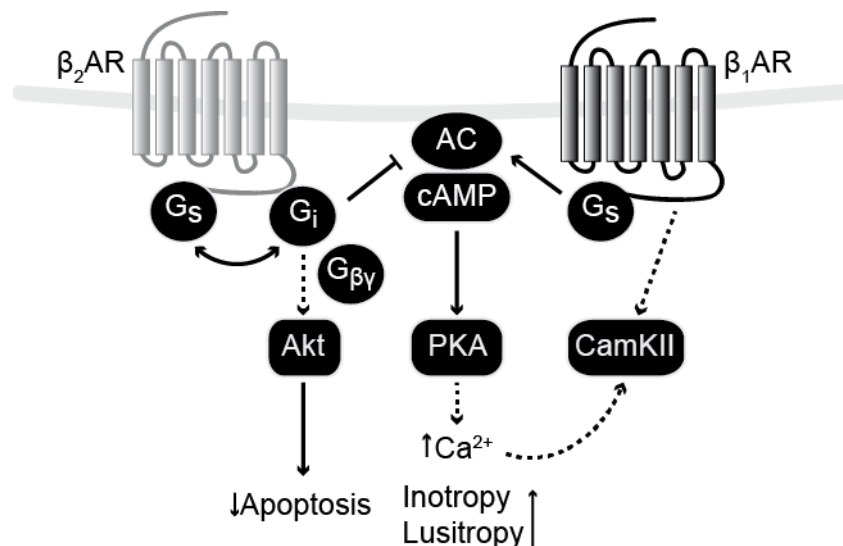
in Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und DAG spaltet. Im weiteren Verlauf bewirkt  $IP_3$  die Ausschüttung von  $Ca^{2+}$ . Seit einiger Zeit werden jedoch auch andere Signalwege und Proteininteraktionen aufgeschlüsselt, die zur PKC-Aktivierung führen. Wie schon in Abschnitt 1.1.4 erwähnt kann das cAMP, das bei der Aktivierung von  $G\alpha_s$  gekoppelten GPCR gebildet wird, zur Aktivierung der Phospholipase C $\epsilon$  (PLC $\epsilon$ ) und zur Freisetzung von Calcium aus den Calciumspeichern führen. Diese Signale werden durch die cAMP-vermittelte Aktivierung von Epac induziert (de Rooij et al., 1998; de Rooij et al., 2000), welches als Guanin-Nukleotid austauschfaktor (GEF) von Rap2B (*Ras related protein 2B*) agiert. Rap2B ist ein Guanin-Nukleotid-bindendes und -hydrolysierendes Protein (*small GTPases*), das die PLC $\epsilon$  aktiviert (Kelley et al., 2001; Lopez et al., 2001; Song et al., 2001).

Im Herzen ist die PKC mit der Aktivierung der PP1 und damit der Verringerung der Kontraktilität (Braz et al., 2004) sowie mit der Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Kaskade, Raf-MEK-ERK-Kaskade assoziiert, welche unter anderem eine Rolle in der Induktion der pathologischen Hypertrophie inne hat (Braz et al., 2002). So zeigt die Deletion der PKC $\alpha$  eine Protektion gegen die Induktion der Herzinsuffizienz sowie eine erhöhte Kontraktilität (Braz et al., 2004). Eine Überexpression hat den gegenteiligen Effekt und bestärkt die Hypothese, dass die PKC-Aktivierung im Herzen mit maladaptiven Prozessen assoziiert ist. Die Aktivierung der PKC $\epsilon$  zeigt im Gegensatz dazu bei vermehrter Aktivierung kardioprotektive Effekte (Dorn et al., 1999). Die Unterschiede ermutigen zu einer genauen Untersuchung der aktiven PKC in dem jeweiligen Modell. Im Bezug auf diese Arbeit ist die PKC durch ihre Rolle in der Phosphorylierung des RKIP wichtig. Durch Corbit et al., 2003 konnte gezeigt werden, dass einige PKC in der Lage sind RKIP zu phosphorylieren, jedoch ist das Ausmaß sehr unterschiedlich und bei den cPKC und aPKC um einiges höher als bei den nPKC. Ferner konnte Deiss et al., 2012 zeigen, dass RKIP im Herzen phosphoryliert vorliegt und somit eine basale PKC-Aktivität ausreicht, um den RKIP-Pool zu einem sehr hohen Anteil zu phosphorylieren.

### 1.1.5 Funktionen der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren im Herzen

Im Herzen regulieren vor allem  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR die Kontraktilität im Hinblick auf Frequenz (Chronotropie), die Kontraktionskraft (Inotropie) und die Relaxation (Lusitropie) (Rohrer et al., 1996). In der Lunge bewirken die  $\beta_2$ AR eine Dilatation der Gefäße und der Bronchien (Ruffolo, 1993; Pourageaud et al., 2005), sowie eine Erhöhung der Freisetzung von Renin und damit verbundene gesteigerte NaCl- und Wasserretention in der Niere (DiBona und Kopp, 1997). Im Fettgewebe reguliert der  $\beta_3$ AR die Fettverbrennung.

Diese Wirkungen sind vor allem auf die unterschiedliche Expression der einzelnen Rezeptoren in den unterschiedlichen Geweben zurückzuführen. Im Herzen werden vor allem der  $\beta_1$ AR und der  $\beta_2$ AR an der Membran detektiert. Der  $\beta_3$ AR ist unter physiologischen Bedingungen nur niedrig exprimiert. Mit der sich entwickelnden Herzinsuffizienz steigt seine Expression an, jedoch sind die resultierenden Effekte noch nicht im Detail untersucht. Im gesunden Herzen besteht zwischen dem  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR ein Verhältnis von ca. 80-20% (Woo und R. P. Xiao, 2012). Neben den Unterschieden im Expressionsniveau sind sie auch unterschiedlich verteilt. Der  $\beta_2$ AR ist vor allem in den sogenannten t-Tubuli (Membraneinstülpungen der extrazellulären Kardiomyozytenmembran) lokalisiert, während der  $\beta_1$ AR an der gesamten Membranoberfläche zu finden ist (Orchard und Brette, 2008; Nikolaev et al., 2010). Diese Unterschiede in der Lokalisation legen die Grundlage für örtlich begrenzte Signalkompartimente.



**Abbildung 1.4:** Signalwege des  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR. Beide  $\beta$ AR können an  $G\alpha_s$  binden und somit die Akkumulation von cAMP verursachen. Zusätzlich kann der  $\beta_2$ AR an  $G\alpha_i$  binden und so die cAMP Akkumulation reduzieren. Neben den  $G\alpha$  vermittelten Signalwegen kann der  $\beta_2$ AR über  $G\beta\gamma$  die Akt aktivieren und der  $\beta_1$ AR die CaMKII. **AC** Adenylatcyclase; **cAMP** zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA** cAMP abhängige Protein Kinase A; **CaMKII**  $Ca^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Kinase II

Den beiden Rezeptorsubtypen werden gegensätzliche Funktionen im Herzen zugesprochen. Obwohl sie ihre Effekte primär gemeinsam über  $G\alpha_s$  vermittelte Signalkaskaden weiterleiten, wird vor allem der  $\beta_1$ AR auch mit maladaptive und proapoptische Signalwegen in Verbindung gebracht, während die  $\beta_2$ AR kardioprotektive Wirkungen haben. Die Assoziation der verschiedenen Phänotypen zu den Rezeptorsubtypen erfolgte durch

die Untersuchung transgener Mäuse und mittels gezielter Stimulation der Rezeptoren. Die  $\beta_1$ AR-transgenen Mäusen zeigten eine vorübergehende positive Inotropie in der Jugend, gefolgt von einer sich mit dem Alter entwickelnden spontanen Herzinsuffizienz und erhöhten Sterblichkeit (Engelhardt et al., 1999). Zusätzlich zeigte auch eine dauerhafte Stimulation des  $\beta_1$ AR einen CaMKII-abhängigen, aber PKA-unabhängigen Anstieg der Apoptose (W. Z. Zhu et al., 2003). Die CaMKII scheint eine entscheidende Rolle für die  $\beta_1$ AR vermittelten maladaptiven Effekte zu spielen. Ihre Aktivierung wird hauptsächlich dem  $\beta_1$ AR zugeschrieben (Pereira et al., 2007; Métrich et al., 2008; Oestreich et al., 2009; Mangmool et al., 2010) und steht selbst in Verbindung mit proapoptotischen Signalwegen und pathologischen Umbauprozessen (T. Zhang et al., 2003; Sag et al., 2009).

Eine weitere Erklärung für diese unterschiedlichen Wirkungen von  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR wird in der Kopplung des  $\beta_2$ AR an die Klasse der inhibitorischen G-Proteine gesehen. Die antiapoptotischen Effekte des  $\beta_2$ AR können durch PTX gehemmt werden und sind damit vom  $G\alpha_i$  abhängig (Chesley et al., 2000). Dieses verursacht eine Verringerung der AC-Aktivität und inhibiert so die cAMP-Produktion (R. P. Xiao et al., 1994; R. P. Xiao et al., 1995). Ferner werden durch die  $G\alpha_i$ -Kopplung und die dazugehörigen  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten über PI3K/Akt antiapoptotische Signalwege aktiviert (K. Singh et al., 2001; W. Z. Zhu et al., 2001). Dass die Fähigkeit des  $\beta_2$ AR an  $G\alpha_i$  zu koppeln entscheidend ist um den Veränderungen während der Herzinsuffizienz entgegenzuwirken, konnte durch W. Zhu et al., 2012 gezeigt werden. Mäuse, denen die PKA-Phosphorylierungsstelle, die die  $G\alpha_i$ -Kopplung im  $\beta_2$ AR verursacht, fehlte, zeigten eine Verschlimmerung der Herzinsuffizienz und einen verfrühten Tod der Mäuse. Eine moderate Überexpression des Wildtyp- $\beta_2$ AR in den Mäusen hatte dagegen positive Wirkung auf die Herzfunktion und eine antiapoptotische Wirkung (Milano et al., 1994). In  $\beta_2$ AR-transgenen Mäusen mit stark erhöhter Überexpression kam es wie schon in den  $\beta_1$ AR-transgenen Mäusen zu einem hyperkontraktilen Phänotyp, welcher in Herzinsuffizienz resultierte (Liggett et al., 2000).

## 1.2 Regulation $\beta$ -adrenerger Rezeptorsignale

Überschießende dauerhafte Aktivierung ist in biologischen Systemen nicht erwünscht. Um sie zu verhindern, werden Regulationsmechanismen benötigt, die meist auf dem Prinzip negativer Rückkopplung beruhen. Bei den GPCR gibt es zwei Wege, die dafür von Bedeutung sind. Zum einen dienen die Phosphorylierungen der GPCR durch

die PKC und PKA als direkter Mechanismus, der die assoziierten G-Proteine von den GPCR entkoppelt und so die Signalweiterleitung stoppt. Dies kann mit Rezeptoren des gleichen Typs, aber auch anderer Typen erfolgen und wird als heterologe Desensibilisierung bezeichnet. Sie ist unabhängig von dem gebundenen Liganden und der Aktivierung des Rezeptors. Eine Folge davon ist z.B. die Umschaltung des  $\beta_2$ AR von der  $G\alpha_s$ - zur  $G\alpha_i$ -Kopplung (Daaka et al., 1997; R. P. Xiao et al., 1999).

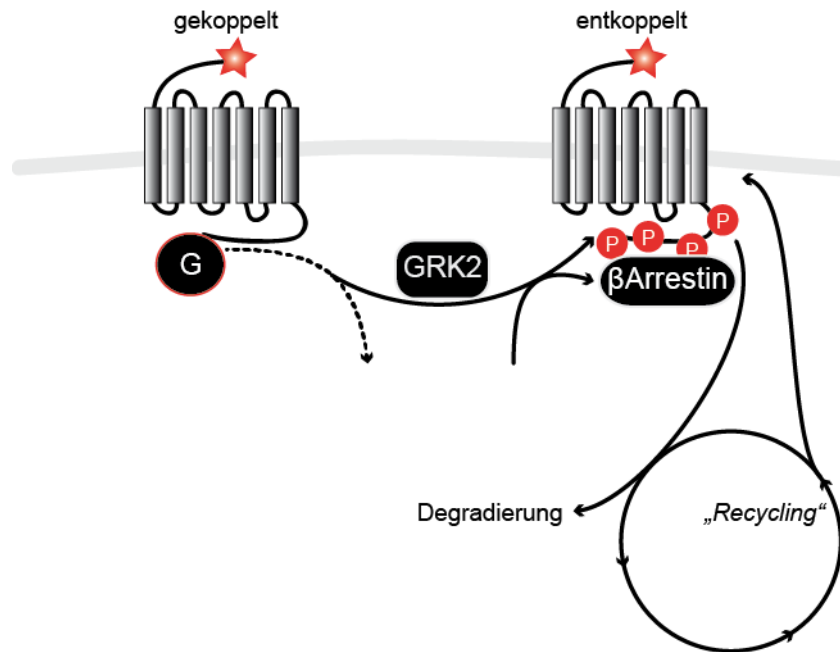
Zum anderen führt die Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK früher auch  $\beta$ AR-Kinasen genannt) zur Desensibilisierung von GPCR. Die aktivierten Rezeptoren werden von den GRK an Serinen und Threoninen des C-Terminus und der dritten intrazellulären Schleife phosphoryliert (Benovic et al., 1986; Pitcher et al., 1992). Dadurch kann  $\beta$ -Arrestin binden und die Assoziation von G-Protein und Rezeptor wird blockiert. Dieser Vorgang wird als homologe Desensibilisierung bezeichnet (Lohse et al., 1990). Die Rekrutierung der GRK wird von dem Rezeptor und dem gebundenen Liganden gesteuert. Letztlich beendet die Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor G-Protein vermittelte Signale und leitet die Internalisierung des Rezeptors ein (Lefkowitz, 1998). Internalisierte Rezeptoren werden entweder degradiert oder nach einer Dephosphorylierung wieder zurück an die Membran transportiert. Dieser Vorgang wird „*receptor-recycling*“ genannt (Pitcher et al., 1998; Moore et al., 2007).

Neben diesen schnellen Regulationsmechanismen können die Rezeptoren auch auf transkriptioneller Ebene, d.h. durch Verringerung oder in selteneren Fällen auch Erhöhung ihrer Expression, beeinflusst werden. Auch dadurch wird die Rezeptorantwort in Folge einer Stimulation modifiziert (Claing et al., 2002; Pierce et al., 2002)

### 1.2.1 Die G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinasen (GRK)

Die GRK gehören zu den AGC-Kinasen und phosphorylieren Serin und Threoninreste. Die Kinasefamilie der GRK besteht aus sieben Subtypen (GRK1-7), die an Hand ihrer Sequenzhomologie und Aktivierungsmechanismus in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Die GRK1 und GRK7 werden als Rhodopsinkinasen bezeichnet, sind membranständig und überwiegend in der Retina exprimiert. Die GRK2 und GRK3 wurden in der Vergangenheit als  $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinasen 1 und 2 bekannt und sind in eine weitere Familie zusammengefasst. Ihr C-Terminus bindet freie  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und  $PIP_2$ , wodurch sie an die Membran und zu den aktivierten Rezeptoren rekrutiert werden. Sie werden ubiquitär exprimiert (Rockman et al., 2002). Die dritte Unterfamilie besteht aus GRK4, GRK5 und GRK6 und wird mit Ausnahme der GRK4, die in den Testes expri-





**Abbildung 1.5:** Regulation der  $\beta$ AR durch die GRK2. Durch die GRK-Phosphorylierungen an dem aktiven Rezeptor werden diese von dem aktivierten G-Protein entkoppelt (rechts) und es kommt zur Bindung von  $\beta$ -Arrestin. Dieses leitet die Internalisierung ein. Internalisierte Rezeptoren werden degradiert oder wieder zurück an die Membran gebracht (*recycling*). **GRK** G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; **G**  $G\alpha_s$  oder  $G\alpha_i$

miert wird, ubiquitär exprimiert. Hier führt eine Palmitoylierung bzw. positiv geladene Aminosäuren zu der Translokation an die Membran (Gurevich et al., 2012). Im Herzen sind vor allem die GRK2 und GRK5 und in geringerem Maße die GRK3 exprimiert (Hata und Koch, 2003). Die GRKs zeigen eine breite Substratspezifität. Vor allem die GRK2 und GRK5 können eine Vielfalt an GPCR phosphorylieren. Die Mechanismen ihrer Spezifität werden intensiv untersucht und werden unter anderem in ihrer Lokalisation vermutet (Reiter und Lefkowitz, 2006; Penela et al., 2010; Gurevich et al., 2012). Neben ihren GPCR-Substraten besitzen GRK jedoch auch zytosolische Substrate, über die sie Einfluss auf die Transkription, das Zytoskelett und Signalweiterleitung der Rezeptortyrosinkinasen nehmen (Penela et al., 2010; Gurevich et al., 2012). Nicht-GPCR-Substrate sind z.B. (a) EGF-Rezeptoren (epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren), die die GRK2 zunächst rekrutieren und im Gegenzug ihre Aktivität durch eine Tyrosinphosphorylierung erhöhen (Hupfeld und Olefsky, 2007); (b) das Tubulin, das der GRK2 die Regulation der Mikrotubulipolymerisierung ermöglicht (Haga et al., 1998; Pitcher et al., 1998); (c) Synucleine, die durch Phosphorylierung an der Interaktion und Inhibition der Phospholipase D2 gehindert werden (Pronin et al., 2000); (d) über Ezrin aus der Ezrin/Radixin/Moesin Familie nimmt die GRK2 Einfluss auf die Zytoskelett Reorganisa-

tion (Cant und Pitcher, 2005); (e) die Phosphorylierung des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  verhindert den Abbau dieses  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Inhibitors und die  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -vermittelte Transkription (Ribas et al., 2007; Partial et al., 2010). Zusätzlich wirkt die GRK als *Scaffold*-Protein für z.B. MEK oder die PI3K (Ribas et al., 2007), indem sie die Assoziation der Interaktionspartner vermittelt. Umgekehrt können auch Proteine die Aktivität oder Lokalisation der GRK beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) zu nennen, das die GRK inhibiert (Lorenz et al., 2003). Eine andere Möglichkeit die Aktivität der GRK zu verringern, ist eine Phosphorylierung durch ERK, die die GRK2/G $\beta\gamma$ -Interaktion inhibiert (Pitcher et al., 1999), wohingegen PKA, PKC und Src-Phosphorylierungen zu einer Erhöhung der Aktivität führen (Sarnago et al., 1999; Elorza et al., 2000).

Über die transkriptionelle Kontrolle der GRK, die vor allem in der Pathophysiologie einiger Krankheiten ein Rolle spielt (Gros et al., 1997; Cohn et al., 2009), ist noch wenig bekannt (Penela et al., 2006; Hullmann et al., 2016). Es scheinen außerdem auch Degradierungsprozesse über das Proteasom von Bedeutung zu sein. So wird der *Turnover* des Proteins durch langanhaltende  $\beta_2\text{AR}$  Aktivität beschleunigt (Elorza et al., 2000).

Um die Rolle der GRK2 im Herzen zu untersuchen, wurden Überexpressions- sowie die Deletionsmutanten erstellt. Eine Überexpression der GRK2 im Herzen führte zu einer reduzierten adrenergen Antwort im Hinblick auf die Kontraktilität und Adenylylcyclaseaktivität sowie eine verringerte Kopplung der  $\beta\text{AR}$  an ihre G-Proteine (Koch et al., 1995). Der globale *Knockout* der Kinase ist letal (Jaber et al., 1996), sodass auf die Untersuchung von konditionellen *Knockouts* und *Knockdowns* ausgewichen werden musste. Ein 50%iger *Knockdown* führte zu einer verstärkten Antwort gegenüber Katecholaminen und zeigte eine erhöhte Kontraktilität und verbesserte kardiale Funktion (Koch et al., 1995). Ein herzspezifischer *Knockout* ist im Gegensatz zum globalen *Knockout* lebensfähig, er zeigt jedoch eine Neigung zu maladaptiven Veränderungen als Reaktion auf adrenerge Stimulation (Matkovich et al., 2006). Auch die im Herzen exprimierte GRK5 führt nach Deletion zu einer gesteigerten Kontraktilität. In einem Tiermodell mit induzierbarer GRK2-Deletion konnte die Herzinsuffizienzentwicklung nach einem Myokardinfarkt verhindert und das Überleben verbessert werden (Raake et al., 2008). Auch eine Langzeithemmung der GRK2 durch myokardiale Injektionen von AAV6-Vektoren, die für den  $\beta\text{ARKct}$  kodieren, zeigte eine erhöhte Kontraktilität, geringere Umstrukturierung und anhaltende Ansprechbarkeit auf Katecholamine (Rengo et al., 2009). Dies führte zur intensiveren Erforschung der GRK2-Deletion und -Inhibition als therapeutische Ansatzpunkte in der Herzinsuffizienztherapie.

Dafür wurde zunächst der C-Terminus der GRK2 ( $\beta\text{ARKct}$ ) verwendet, der G $\beta\gamma$ -Unter-

einheiten bindet, die Rekrutierung der GRK2 an die Zellmembran hemmt (Koch et al., 1995) und so eine Desensibilisierung der Rezeptoren und deren Internalisierung verhindert. Die  $\beta$ ARKct-Überexpression führte basal und nach Stimulation zu einer erhöhten Kontraktilität (Rockman et al., 1998), sowie einer Verbesserung der kardialen Funktion in verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen (Penela et al., 2006).

In jüngster Zeit wurde auch ein weiterer chemischer GRK-Inhibitor im Herzen untersucht. Paroxetin ist ein selektiver Serotonin Wiederaufnahme Inhibitor (SSRI), der eine hohe Affinität und Spezifität zur GRK2 aufweist. Die Behandlung mit Paroxetin führte zu einer erhöhten Isoprenalin-induzierten positiven Inotropie. In einem Therapieversuch nach Myokardinfarkt konnten der Verlust der kontraktilen Funktion sowie die Umbauprozesse gestoppt oder umgekehrt werden. Der Ansatzpunkt der GRK2-Inhibition führte zu der Untersuchung des Raf Kinase Inhibitor Proteins als einem endogenen GRK2-Inhibitor (Lorenz et al., 2003).

### 1.2.2 Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP)

Der Gename des RKIP ist Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein1 (*Pebp1*) und somit ist RKIP auch Mitglied der gleichnamigen Proteinfamilie. Diese Familie ist eine evolutionär konservierte Gruppe von 21-23 kDa schweren Proteinen, die in einer Reihe von Organismen zu finden ist (Archea, Bakterien und Eukaryonten) und eine relativ hohe Expression aufweisen. Darunter sind Hefen, Bakterien, Pflanzen, Nematoden, Insekten und Säugetiere (Hickox et al., 2002). Der PEBP-Familie, mit ca. 400 Mitgliedern, ist eine konservierten Struktur gemeinsam, die eine Bindungstasche für Phosphatidylethanolamin und andere Lipide hat und keine Kinaseaktivität besitzt (Zeng et al., 2008). Jedoch ist die Affinität zum Phosphatidylethanolamin eher schwach ausgeprägt (Vallee et al., 2001), sodass der Bindungstasche eher eine allosterische Funktion beim Wechsel der Interaktionspartner zugeschrieben wird (Skinner und Rosner, 2014).

In Säugetieren wurde vor allem die Isoformen des PEBP1 oder auch RKIP charakterisiert. RKIP ist ein lösliches Protein, besteht aus 187 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa. Die Struktur kann als eine kompakte Kugel beschrieben werden und besteht aus einem großen zentralen  $\beta$ -Faltblatt, mit fünf anti-parallelen Strängen, das von mehreren  $\alpha$ -Helices und einem kleineren  $\beta$ -Faltblatt umgeben ist (Banfield et al., 1998; Granovsky et al., 2009). Die verbindenden *Loops* besitzen eine große Variabilität in ihrer Ausrichtung zwischen den verschiedenen Homologen in Pro- bzw. Eukaryoten. Es wird vermutet, dass sich diese Regionen veränderlichen Interaktionspartnern anpassen (Banfield und Brady, 2000). Die Phosphatidylethanolamin-bindende Region betrifft

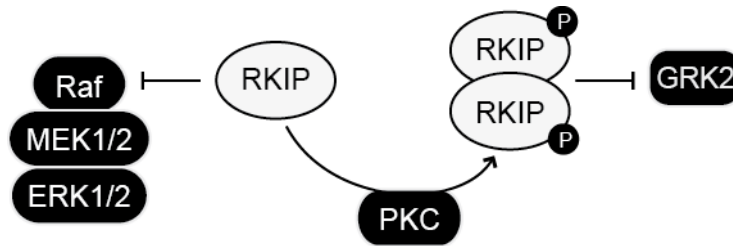
das Ende des zentralen  $\beta$ -Faltblatts, schließt die Aminosäuren Asparagin 70, Histidin 86, Tyrosin 120 und Glycin 110 ein und ist bedeutsam für die Interaktion mit Raf (K. Yeung et al., 1999). Die Bindungstasche liegt im Zentrum des Proteins und ist nur durch einen engen Spalt zugänglich. Dadurch wird ihr eine Funktion in der Lokalisation von RKIP abgesprochen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine variable Lokalisation des RKIP beobachten. So ist es unter bestimmten Umständen membrangebunden. Für diese Membranlokalisation, wie sie bei der Interaktion mit Raf und Opioidrezeptoren beobachtet wurde, wird eine elektrostatische Anziehung zu den Lysininen im Bereich des N- und C-Terminus verantwortlich gemacht (Vallee et al., 2001).

Nach und nach wurden mehrere Proteine bzw. Kinasen identifiziert, die an RKIP binden und deren Aktivität durch die Interaktion reguliert wird. Dadurch geriet die Fähigkeit Phosphatidylethanolamin zu binden in den Hintergrund und die physiologische Funktion und Bedeutung bleibt bis heute unklar (Skinner und Rosner, 2014). RKIP wurde als potenter Kinaseregulator charakterisiert, der auf einige zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Differenzierung, Wachstum, Migration und Apoptose wirkt. Die Interaktionen mit Raf, GRK2, NIK (*NF $\kappa$ B inducing kinase*), TAK1 (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1*) und der Glykogensynthasekinase  $3\beta$  (GSK $3\beta$ ) wurden experimentell bestätigt, wobei bisher nur die Bindung von RKIP mit Raf, MEK, ERK und der GRK2 als direkte Interaktionen charakterisiert werden konnten (K. Yeung et al., 1999; K. C. Yeung et al., 2001; Lorenz et al., 2003; Zeng et al., 2008). RKIP nimmt somit Einfluss auf (a) die MAPK-Kaskade Raf-MEK-ERK, indem es Raf inhibiert (K. Yeung et al., 1999); (b) die GPCR-Sensitivierung, durch die Inhibition der GRK2 (Lorenz et al., 2003); (c) den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer* of activated B-cells), durch die Hemmung des Abbaus der NF $\kappa$ B-Inhibitoren I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  (K. C. Yeung et al., 2001); (d) die Glykogensynthasekinase  $3\beta$  (GSK $3\beta$ ), durch Stabilisierung ihrer aktiven Konformation (Al-Mulla et al., 2012).

Zusätzlich zu den Proteininteraktionen kann ein Teil des RKIP als Peptid ausgeschüttet werden und Zell-übergreifende Wirkungen haben. Dafür wird ein elf Aminosäuren-langes Peptid des N-Terminus abgespalten, welches als HCNP (*hippocampal cholinergic neurostimulating peptide*) die Acetylcholintransferase stimuliert und so die Differenzierung von cholinergen Neuronen im Hippocampus fördert (Ojika et al., 2000). Ferner wurde gezeigt, dass das HCNP auch sezerniert werden kann und negativ inotrope Effekte in Rattenherzen ausübt (Angelone et al., 2006).

RKIP wurde *in vitro* als Serinproteaseinhibitor identifiziert. Zu den betroffenen Proteasen zählen Thrombin, Neuropsin und Chymotrypsin. In welcher Weise sich diese Fä-

higkeit auf zelluläre Prozesse auswirkt ist jedoch unklar (Hengst et al., 2001).



**Abbildung 1.6:** Mechanismus des Umschaltens von der Raf-Inhibition zur GRK2-Inhibition. Die PKC-vermittelte Phosphorylierung an Serin 153 führt zur Dimerisierung und nachfolgenden Interaktion mit der GRK2, (Lorenz et al., 2003; Deiss et al., 2012). **RKIP** Raf Kinase Inhibitor Protein; **MEK** Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase; **ERK** Extracellular signal-regulated kinase; **PKC** Protein Kinase C; **GRK2** G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase

### RKIP als GRK2-Inhibitor

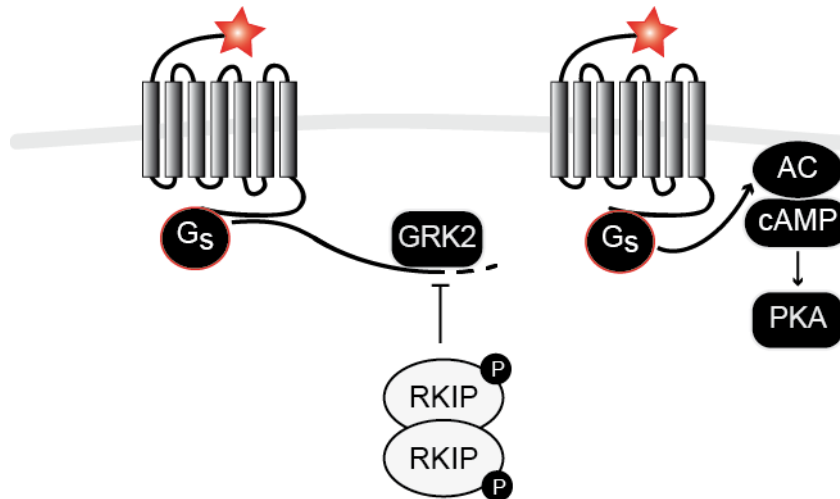
Nur für Raf und GRK2 ist der Mechanismus bekannt, durch den die inhibitorische Wirkung des RKIP reguliert wird. Die Interaktion von RKIP und GRK2 wurde von Lorenz et al., 2003 entdeckt und charakterisiert. Im weiteren Verlauf konnten Deiss et al., 2012 den Mechanismus detaillierter beschreiben. Eine PKC-vermittelte Phosphorylierung an Serin 153 des RKIP führt zur Dimerisierung zweier phosphorylierter RKIP-Monomere und schließlich zur GRK2-Bindung (Deiss et al., 2012). In Abbildung 1.6 ist der Mechanismus des Substratwechsels schematisch dargestellt. Durch Skinner et al. entstand die Hypothese eines dreistufigen Modells, durch das der Substratwechsel erklärt werden könnte (Skinner und Rosner, 2014). Neben den Zuständen, in denen RKIP an Raf oder GRK2 gebunden ist, gibt es einen energetisch höheren Zustand, der mittels NMR und der Austauschmutante (P74L) mit geringerer Affinität zu Raf bestätigt wurde (Granovsky et al., 2009). In diesem Zustand ist die Bindung zu Raf geringer und das Serin 153 der RKIP-Monomere zugänglicher für die PKC. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte RKIP nur im Komplex mit Raf kristallisiert werden, sodass die strukturellen Unterschiede des RKIP noch nicht genau bestimmt werden können. Jedoch liegt es nahe, dass die  $\alpha$ -Helix, in der das Serin 153 liegt, für die Phosphorylierung durch die PKC entwunden ist (Skinner und Rosner, 2014). Die Phosphorylierung an Serin 153 führt zu einer Konformationsänderung des angrenzenden *Loops* (Aminosäuren 127-150), der bereits als Dimerisierungsschnittstelle charakterisiert wurde (Banfield et al., 1998; Deiss et al., 2012). So zeigte sich durch die Untersuchung einer vorwiegend als Dimer vorliegenden Mutante des RKIP auch, dass die Phosphorylierung an Serin 153 für die Dimerisierung

benötigt wird, jedoch nicht an der Bindung der GRK2 beteiligt ist (Deiss et al., 2012). Durch Lorenz et al., 2003 konnte RKIP ferner als sehr potenter und spezifischer GRK2-Inhibitor charakterisiert werden. Andere getestete Kinasen wie die PKA oder PKC, sowie die GRK5 wurden gar nicht oder nur in geringem Maße inhibiert. Endogene Inhibitoren der GRK2 wie Calmodulin oder  $\alpha$ -Aktinin (Chuang et al., 1996; Freeman et al., 2000) zeigen ein breites Interaktionsspektrum außerhalb der GRKs und eine auf die GRK-Familien-begrenzte Isoformspezifität (Sallese et al., 2000). Ferner konnte in Kardiomyozyten durch eine RKIP-Reduktion bereits eine Verringerung der Kontraktilität erzielt werden, was eine physiologische Bedeutung der RKIP-vermittelten GRK2-Hemmung verdeutlicht (Lorenz et al., 2003). Durch die Interaktion von RKIP und GRK2 wird die Kinaseaktivität und so die Rezeptorphosphorylierung und Rezeptorinternalisierung gehemmt. Abbildung 1.7 zeigt ein Schema der RKIP-Wirkung auf nachgeschaltete Signalwege.

Es ist noch nicht bekannt, welche Domäne des RKIP-Dimer mit GRK2 interagiert. Auf der Seite der GRK2 wurde der N-Terminus, der unter anderem auch die Bindung an aktivierte Rezeptoren vermittelt, identifiziert (Lorenz et al., 2003; Huang und Tesmer, 2011). Die Induktion der Serin 153 Phosphorylierung ist von besonderer Bedeutung für den „Wechsel“ des Interaktionspartners und somit ist die Regulation dieser von Interesse. Es wurde gezeigt, dass die Stimulation einiger GPCR und auch RTKs PKC aktivieren und so die Phosphorylierung an Serin 153 verursachen können. Dieser Mechanismus ist unter anderem für den  $\beta_2$ AR gezeigt worden (Lorenz et al., 2003). Als agierende PKC konnten Isoformen aller Klassen identifiziert werden, wobei die nPKCs RKIP nur in sehr geringem Maße phosphorylieren (Corbit et al., 2003; Lorenz et al., 2003).

### **RKIP als Raf-Kinase-Inhibitor**

Raf ist ein Bestandteil einer Mitogen-aktivierten Kinase Kaskade (MAPK-Kaskade). Diese Kaskaden bestehen aus einer Reihe von drei Serin/Threonin Kinasen (MAPKKK, MAPKK, MAPK), die einander sequentiell phosphorylieren und so die zelluläre Antwort auf extrazelluläre Signale vermitteln (Kolch, 2000; Kolch, 2005 siehe auch Abbildung 1.6). Im Falle von Raf, die eine MAPKKK ist, besteht die weitere Kaskade aus der MAPKK MEK1/2 (MAPK/ERK-Kinase) und der MAPK ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated Kinase*). Die eigentlichen Effektorinasen sind die MAPK, die letztendlich Transkriptionsfaktoren im Zellkern, sowie membranständige Rezeptoren und zytosolische strukturgebende Proteine phosphorylieren (Kolch, 2000; Kolch, 2005).



**Abbildung 1.7:** Auswirkungen der GRK2-Inhibition durch RKIP. Durch das Fehlen der GRK2-Phosphorylierung am Rezeptor behält er seine Signaleigenschaften bei. Die Rezeptorsignale werden verlängert und damit verstärkt (Lorenz et al., 2003; Deiss et al., 2012). **GRK2** G-Proteingekoppelte Rezeptor Kinase; **RKIP** Raf Kinase Inhibitor Protein; **AC** Adenylylzyklase; **cAMP** zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA** cAMP abhängige Protein Kinase A.

Dadurch werden zelluläre Prozesse wie die Differenzierung, Proliferation, Migration, Metabolismus sowie Zellüberleben und Zelltod reguliert. Die ERK-Aktivierung und ihre Effekte gelten sowohl als protektiv als auch als maladaptiv. Ein gut untersuchtes Beispiel sind die antiapoptotischen und prohypertrophen Wirkungen im Herzen (Lorenz et al., 2009), die die Inhibition der ERK-Aktivierung als therapeutischen Angriffspunkt, wie z.B. durch MEK-Inhibitoren versucht, erschweren (Ruppert et al., 2013).

Durch die Entdeckung der inhibitorischen Wirkung des PEBP1 gegenüber Raf wurde es mit dem Namen Raf Kinase inhibitorisches Protein - kurz RKIP - versehen. Die Interaktion von Raf1 und RKIP wurde zunächst in einer Hefe-zwei-Hybrid-Rasteruntersuchung (Yeast-two-Hybrid-Screen) entdeckt und die inhibitorischen Effekte dieser Interaktion auf die Raf/MEK/ERK-Kaskade *in vitro* charakterisiert (K. Yeung et al., 1999). Die Aktivierung von Raf erfolgt hauptsächlich über die Aufhebung der autoinhibitorischen Konformation, die Translokation an die Membran durch die GTPase Ras und Phosphorylierungsereignissen an dem regulatorischen Serin 338 und Tyrosin 341 am N-Terminus von Raf (Roskoski, 2010; Maurer et al., 2011; Skinner und Rosner, 2014). An der Bindung von RKIP an Raf ist die Bindungstasche von RKIP und das Tyrosin 341 des Raf beteiligt (Trakul und Rosner, 2005). Dabei dringt Raf nicht in die Bindungstasche des RKIP ein. RKIP hemmt die Phosphorylierung von MEK1/2 kompetitiv, d.h. dass RKIP selbst die Bindungsschnittstelle der beiden Kinasen blockiert (K. Yeung et al., 2000). Grundsätzlich besitzt RKIP die Fähigkeit alle Kinasen dieser MAPK-Kaskade zu binden, jedoch

wird nur die Phosphorylierung von MEK1/2 durch Raf gehemmt (K. Yeung et al., 1999).

### Physiologische Effekte der RKIP-Expression

Ein Ansatz um die physiologischen RKIP-Effekte zu untersuchen, ist die Depletion von RKIP *in vitro* oder *in vivo*, bzw. die Identifikation von Bedingungen unter denen sich die Expression ändert.

Der RKIP-*Knockout* in der Maus zeigte keine phänotypischen Auffälligkeiten. Ein von Moffit et al., 2007 publizierter Effekt, der eine verringerte Dekapitation von Spermien und damit eine verringerte Fortpflanzung der homozygoten *Knockouts* zeigte, konnte nach der Rückkreuzung dieser Mäuse in einen C57Bl/6 Hintergrund nicht mehr beobachtet werden (Sedivy, 2011). Dieser unauffällige Phänotyp kann durch eine Kompensation des RKIP-Verlusts durch homologe Proteine zu Stande kommen (Zeng et al., 2008). Bei der Maus sind fünf Isoformen bzw. Pseudogene (PEBP1-5) bekannt, die eine 90% Aminosäureähnlichkeit zeigen (Banfield und Brady, 2000).

- Das als PEBP1 und RKIP bezeichnete Mitglied der Gruppe wurde ursprünglich im Gehirn von Säugetieren gefunden und zeigt neben dem Gehirn seine höchste Expression in den Testes. Es wird jedoch auch in einer Vielzahl anderer Gewebe und Zelltypen exprimiert (Frayne et al., 1999; Ojika et al., 2000; Z. Fu et al., 2003).
- PEBP2 ist intronlos und fast ausschließlich in den Hoden exprimiert. Es zeigt eine geringere Sequenzhomologie zu RKIP als PEBP3 und 5. Strukturell und funktionell ist es dem RKIP aber sehr ähnlich. So besitzt auch PEBP2, analog zu RKIP, Raf- und MEK-bindende Regionen sowie eine Bindungstasche für Phosphatidylethanolamin (Hickox et al., 2002).
- PEBP3 ist intronlos und wird als Pseudogen bezeichnet, d.h. es konnte bis jetzt noch keine Expression nachgewiesen werden (Theroux et al., 2007).
- PEBP4 ist in der Retina, im Muskel und der Schilddrüse exprimiert sowie in einigen Tumorarten (Wang et al., 2004). In jüngster Zeit zeigte sich eine komplementäre Rolle zu der des RKIP. Es wird in metastasierenden Krebsarten hochreguliert und zeigt eine Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade (Y. Zhang et al., 2007).
- Das PEBP5 wird wie schon das PEBP3 als Pseudogen bezeichnet (Theroux et al., 2007).



Ob und in wie weit die Isoformen in der Lage sind eine Verringerung der RKIP-Expression auszugleichen ist noch unklar und muss im Einzelfall untersucht werden. Durch *in vitro* Untersuchungen zeigte sich, dass die RKIP-Expression eine Rolle bei Asthma (J. Zhao und Wenzel, 2014), der Herzfunktion (Lorenz et al., 2003), Alzheimer (Okita et al., 2009) und bei einer Reihe von metastasierenden Krebsarten spielt. Vor allem in Unterformen von Brust-, Prostata und Darmkrebs wurde eine Herabregulation von RKIP beobachtet (Z. Fu et al., 2003; Beach et al., 2008; Gimenez et al., 2010; Hu et al., 2011; Huerta-Yepey et al., 2011; Maurer et al., 2011; Yan et al., 2012; Kan et al., 2013). So zeigte sich in vielen Krebsformen eine positive Korrelation zwischen dem Maß an RKIP-Expression und dem Differenzierungsstatus der Krebszellen und eine negative Korrelation zwischen der RKIP-Expression und der Metastasierung, sowie Tumordinfiltration (Yan et al., 2012). Die Reexpression hat die Verringerung der Metastasierung zu Folge und die Krebszellen wurden empfänglicher für die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika und Radiotherapie (Zeng et al., 2008; Escara-Wilke et al., 2012). Es ist umstritten über welche Interaktionspartner oder im Speziellen über welche Kinasen RKIP diese Wirkungen vermittelt. Besonderes Augenmerk liegt auf (a) der verstärkten ERK1/2-Aktivität die eine verstärkte Proliferation sowie Metastasierung bedingen kann (Maresch et al., 2011; Al-Mulla et al., 2012); (b) einer gestiegenen Aktivität der GSK3 $\beta$ , die die Tumordinfiltration steigert (Al-Mulla et al., 2011); (c) der Inhibition der NF $\kappa$ B-vermittelten Expression, die die Apoptoseeigung senken und zu einer Immortalisierung der Tumorzellen beitragen kann (K. C. Yeung et al., 2001; Beshir et al., 2010; Sedivy, 2011); (d) einer gesenkten Lokalisation der Aurora B Kinase an die Kinetochore, wodurch der Zellzyklus gestört und eine chromosomale Instabilität verursacht werden (Eves et al., 2006).

Auch die RKIP Expression im Herzen wurde untersucht. X. Fu et al., 2013 zeigten, dass eine Erhöhung der RKIP-Expression zu einer spontanen Entwicklung von Herzinsuffizienzsymptomen wie Apoptose, Hypertrophie, Verringerung der Ejektionsfraktion und linksventrikulärer Dilatation führt (nach fünf Monaten in C57BL/6J; nach zehn Wochen in FVB/N Mäusen), die durch duale Inhibition der Raf/MEK/ERK und GRK2 verursacht werden (X. Fu et al., 2013).

### 1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz wird der Zustand des Herzen bezeichnet, in dem es nicht mehr in der Lage ist, die Peripherie ausreichend mit Blut und damit mit Sauerstoff zu versorgen

(Spinarova und Vitovec, 2007). Über 75% der Betroffenen sind über 65 Jahre alt und die Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz sind vielfältig. Meist entsteht sie als Folge einer koronaren Herzkrankheit (KHK), jedoch können auch Infektionen oder langanhaltende Hypertonie oder genetisch-bedingte Kardiomyopathien ursächlich sein (Fox, 2001).

Die erhöhten Anforderungen an das Herz, die durch eine Volumenüberlastung (Vorlast) oder die Drucküberlastung (Nachlast) verursacht werden, wirken sich zunächst in einer Überdehnung des Ventrikels aus, sodass es zu verschiedenen Antworten kommt. Um die Blutversorgung aufrecht erhalten zu können, werden zunächst Druck/Dehnungsrezeptoren, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der Sympathikus aktiviert (Levine et al., 1982). Dies führt zur Steigerung der kardialen Kontraktilität (positive Inotropie, Lusitropie, Chronotropie) und des Blutdrucks (Freisetzung von Renin, Steigerung des Blutvolumens, Verengung der Gefäße). Auch wenn diese Mechanismen kurzfristig helfen, die Blutversorgung durch Verbesserung der kardialen Pumpfunktion zu erhalten und den ventrikulären Wandstress zu verringern, wird das Herz durch die dauerhafte Erhöhung der zirkulierenden Katecholamine, Endothelin und AngiotensinII ständig mit einer erhöhten Arbeitslast konfrontiert, welche im Herzen und im Speziellen in den Kardiomyozyten zu Veränderungen führen kann. Die maladaptiven Prozesse des Herzen werden auch *Cardiac remodelling* genannt und sind charakteristisch für die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz und können letztendlich den Tod des Betroffenen verursachen (Teerlink et al., 1994; Blaufarb und Sonnenblick, 1996; Hasenfuss et al., 1996; Olivetti et al., 1997; Hill und Olson, 2008; Kehat und Molkentin, 2010; Burchfield et al., 2013).

Für die medikamentöse Therapie werden vor allem Einzel- und Kombinationstherapien aus  $\beta$ AR-Antagonisten ( $\beta$ -Blocker), ACE-Hemmer (*Angiotensin Converting Enzym*), AngiotensinII-Rezeptor Antagonisten, Diuretika und Herzglykosiden verwendet. Ziel ist es dabei, die Verschlimmerung der linksventrikulären Funktion aufzuhalten, sowie den Blutkreislauf und damit die Symptome zu verbessern, um letztendlich die Mortalität und die Hospitalisierungsrate zu senken (Beckwith und Munger, 1993; Waagstein et al., 1993; Foody et al., 2002; Lee et al., 2004; McMurray und Pfeffer, 2005).

### 1.3.1 Strukturelle Veränderungen in der Herzinsuffizienz

Die strukturellen Unterschiede eines gesunden und eines insuffizienten Herzen bestehen vor allem in der Entstehung einer Hypertrophie und Fibrose. Diese beiden Vorgänge beschreiben die Hauptkomponenten der kardialen Umstrukturierung und sind ein Re-

sultat von Kardiomyozytenhypertrophie, sowie Hyperplasie und Hypertrophie von nicht-Kardiomyozyten (Tham et al., 2015).

Der Ursprung der strukturellen Veränderungen des Herzen besteht in dem Bestreben die Spannung von einer durch Vor- oder Nachlasterhöhung überdehnten Herzwand zu nehmen. Nach dem Laplace'schen Gesetz, das die Abhängigkeit des Ventrikeldrucks, vom Ventrikelformfaktor, der Wandspannung und der Wanddicke beschreibt, kann die Dehnung der Herzwand verringert werden, indem die Wanddicke zunimmt (Katz, 1994). Da Kardiomyozyten postmitotische ausdifferenzierte Zellen sind, erfolgt das Myozytenwachstum durch Ausbildung neuer Sarkomere (Hill und Olson, 2008). Dabei wird unterschieden, ob die neuen Sarkomere in Reihe angeordnet werden (exzentrisches Wachstum) und so die Kardiomyozyten verlängern oder ob sie parallel angeordnet werden (konzentrisches Wachstum, Frey und Olson, 2003), sodass der Querschnitt der Kardiomyozyten größer wird. Das konzentrische Wachstum ist eine Reaktion auf eine Drucküberlastung (Maillet et al., 2013) und zeichnet sich durch eine verdickte Herzwand aus. Das exzentrische Wachstum ist ein Phänomen, das bei einer Volumenüberlastung des Herzens und auch in frühen Entwicklungsstadien von Neugeborenen zu beobachten ist. Es führt zu einer Dilatation des Ventrikels. Das konzentrische und exzentrische Wachstum des Herzens sind allein oder in Kombination Grundlagen einer pathologischen Hypertrophie (Kehat und Molkentin, 2010). Daneben existiert auch die physiologische Hypertrophie. Die Ziele beider Anpassungsformen sind die Gleichen, unterscheiden sich jedoch in der mechanistischen Umsetzung, sodass bei der pathologischen Hypertrophie auch maladaptive Mechanismen zum Tragen kommen (Kehat und Molkentin, 2010). Ein gravierender Unterschied zwischen beiden Hypertrophieformen scheint die Dauer und Periodizität (chronische Hypertonie *vs.* Leistungsport) der Belastung zu sein. Die physiologische Hypertrophie ist geprägt von langlebigen Umbauten, während bei der pathologischen Hypertrophie schnelle funktionsstarke Mechanismen engagiert werden, die keine langanhaltende Verbesserung gegenüber den ständig steigenden Ansprüchen gewährleisten können (Maillet et al., 2013).

Zur physiologischen Art gehören das postnatale Wachstum des Herzen und die Hypertrophie während einer Schwangerschaft oder im Leistungsport. Die Mechanismen des Wachstums sind streng reguliert und resultieren in der Verringerung der Wandspannung, der Verbesserung der Pumpfunktion und auch der Vaskularisierung des Herzens, während die maladaptiven Reaktionen, der erhöhten Leistungsanforderungen, inhibiert werden (Hill und Olson, 2008; Maillet et al., 2013). Das physiologische Wachstum wird über Signalwege des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), dem *Insulin-like grow-*

*th factor* (IGF1) und dem Somatotropin vermittelt und verläuft unter anderem über die Aktivierung der PI3K/Akt-Kaskade und des mTOR-Komplex, sowie ERK1/2 und der *AMP activated protein kinase* (Matsui et al., 2003; Kemi et al., 2008; Maillet et al., 2013). Die pathologische Hypertrophie bildet sich unter der schon erwähnten chronischen neurohumoralen Aktivierung und abnormalen mechanischen Dehnung des Myokards in Folge von Myokardinfarkten, Drucküberlastung oder Infektionen aus (Hill und Olson, 2008; Kehat und Molkentin, 2010; van Berlo et al., 2013). Die agierenden Hormone sind Katecholamine, AngiotensinII und Endothelin1. Sie bewirken eine Verschiebung des Kinase- und Phosphataseprofils dahingehend, dass nun kritische Kinasen wie die PKA, PKC, CaMKII, Calcineurin, GRK und verschiedene MAPK-Kaskaden aktiviert werden (Benovic et al., 1986; Molkentin et al., 1998; Backs et al., 2009; Kehat und Molkentin, 2010; van Berlo et al., 2013). Dadurch verändert sich neben dem Calcium-*Cycling* und der Kontraktilität auch der Energiehaushalt und die Genexpression der Zelle (Taegtmeyer et al., 2010). Die Folge kann die Einleitung der Apoptose des Kardiomyozyten sein und damit die weitere Schwächung der Kontraktionskraft durch Verlust der kontraktile Einheiten (Swynghedauw, 1999; Kehat und Molkentin, 2010). Die Apoptoseinduktion kann auch durch die mit der pathologischen Hypertrophie einhergehenden Reduktion der Kapillardichte verursacht werden. Dem erhöhten Sauerstoffbedarf der wachsenden Kardiomyozyten sollte sich das Gefäßsystem anpassen. Das Ausbleiben verursacht Hypoxie bzw. ischämische Mikroareale, die die Pathologie weiter verschlimmern (Burchfield et al., 2013).

Zusätzlich kommt es beim Absterben von Zellen zu einer reparativen Fibrose (Burchfield et al., 2013). Aber auch die verbleibenden Kardiomyozyten nehmen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix. Es kommt zur Proliferation und dem Wachstum der kardialen Fibroblasten, welche wiederum die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix verursachen (Miragoli et al., 2007). Dabei wird die Expression von Kollagenen des Typ I und III und Fibronectin erhöht (Spinale, 2007). Auch die Matrix Metalloproteinasen, vor allem MMP2 und MMP9, die die extrazelluläre Matrix ab- und umbauen, zeigen höhere Expressionslevel (Spinale, 2007). Daraus ergibt sich eine interstitielle Fibrose, die die Erregungsleitung des Herzens behindern kann und zusätzlich eine Versteifung des Myokards verursacht, dessen kontraktile Funktion und Erregungsleitung damit weiter geschwächt wird (Swynghedauw, 1999; Kehat und Molkentin, 2010; Burchfield et al., 2013).

### 1.3.2 Zelluläre Veränderungen in der Herzinsuffizienz

Die chronische neurohumorale Aktivierung, sowie die mechanische Belastung des Herzens führen zur Expression spezieller Gene, die in ihrer Gesamtheit auch als fetales Genprogramm bezeichnet werden. Dieses wirkt sich auf mehrere Bereiche aus, die einerseits den einzelnen Kardiomyozyten betreffen oder im ganzen Körper wirken. Zu den hormonellen Adaptionen zählt die Expression der natriuretischen Peptide ANF (*atrial natriuretic factor*) und BNP (*brain natriuretic peptide*). Sie wirken über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase G (PKG) diuretisch und vasodilatierend und haben damit Einfluss auf die Senkung des Blutdrucks und des Plasmavolumens (Molkentin et al., 1998; Kehat und Molkentin, 2010). Auf zellulärer Ebene haben die transkriptionellen Veränderungen Einfluss auf die ATP-Produktion in den Mitochondrien, die Zusammensetzung des kontraktilen Apparats und die elektromechanische Kopplung.

### Metabolische Veränderungen

Die bedeutendste Veränderung bei der Rückkehr zum fetalen Genprogramm ist die Umstellung von einem Fettsäuremetabolismus zur Glykolyse. Das ist begründet in der besseren Energieeffizienz der Glukoseoxidation. Es stellt eine erste akute Adaption dar, die ein Energiedefizit verhindern und vor allem die für die elektromechanische Kopplung benötigte Energie für Transporter und Pumpen bereitstellen soll (Taegtmeyer et al., 2010). Eine bedeutende Rolle in der Regulation des Metabolismus in Mitochondrien haben die Akt/PKBs. Sie vermitteln die erhöhte Glukoseaufnahme über GLUT4 und inhibieren die Fettsäureoxidation durch Inhibition der *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ) vermittelten Transkription (Matsui et al., 2003). In insuffizienten Herzen sind somit die Gene, die durch den PPAR $\alpha$  kontrolliert werden und die meisten Proteine und Enzyme kodieren, die für den Fettsäuretransport oder -Abbau benötigt werden, herunter reguliert (Razeghi et al., 2001). Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist Sp1 (*specificity Protein 1*). Der gestiegene Glukoselevel führt zu seiner Glykosilierung und so zur Stabilisierung des Sp1, wodurch weitere fetale Gene angeschaltet werden. So haben die metabolischen Veränderungen auch Einfluss auf das zelluläre transkriptionelle Programm.

Neben den metabolischen Aufgaben der Mitochondrien, haben sie auch eine bedeutende Rolle in der Induktion der Apoptose. Kardiomyozytenapoptose kann durch die CaMKII über einen mitochondrialen Signalweg eingeleitet werden. Dies erfolgt über die Effekte der CaMKII auf das mitochondriale Calcium (T. Zhang et al., 2010) und auch über ih-

re Wirkung auf p53 und das proapoptotische BAX (Aikawa et al., 2000; Manning und Cantley, 2007).

### Veränderungen der elektromechanischen Kopplung

Ein gestörtes Calcium-*Cycling* in den Kardiomyozyten ist eine der Hauptursachen für kontraktile Dysfunktionen und das Aufkommen von Arrhythmien während der Herzinsuffizienz. Es ist durch Veränderungen in der Expression von entscheidenden Proteinen der elektromechanischen Kopplung bedingt.

Proteine, deren Expression in der Herzinsuffizienz

erhöht ist:

NCX

CaMKII

PKA

PKC

GRK2

$G\alpha_i$

verringert ist:

SERCA2

LTCC

$\beta_1$ AR

Muskarinrezeptor 2

S100A1

Auf die für die Herzfunktion bedeutendsten Proteine wird im Folgenden eingegangen. Durch die Veränderungen bei  $\beta_1$ AR, GRK und  $G\alpha_i$  kommt es zu einem Verlust der Erreg- bzw. Steuerbarkeit der Kardiomyozyten. Durch die Herabregulation des  $\beta_1$ AR auf mRNA-Ebene (Bristow et al., 1986; Bristow et al., 1993) wird seine Dichte bereits um 50% verringert, während die Expression des  $\beta_2$ AR nicht beeinflusst wird (Bristow et al., 1989). Das  $\beta_1$ : $\beta_2$ -Verhältnis verschiebt sich von ursprünglich 80:20 auf 60:40, so dass die Signalwege des  $\beta_2$ AR an Bedeutung gewinnen. Da auch die Expression des  $G\alpha_i$  hochreguliert (Böhm et al., 1994) wird und die  $\beta_2$ / $G\alpha_i$ -Kopplung in der Herzinsuffizienz bevorzugt wird, werden die positiv inotropen Signale des  $\beta_1$ AR weiter vermindert (Bristow et al., 1989; W. Zhu et al., 2012). Zusätzlich zu den transkriptionellen Veränderungen wird die Signaleffizienz auch durch die GRK-vermittelte Desensitivierung weiter verringert (Bristow et al., 1982). Die verstärkte GRK2-Expression und Aktivität wurde in verschiedenen Pathologien des Herzens beobachtet. Erhöhte mRNA-Level zeigten sich im linken Ventrikel von ICM- und DCM-Patienten, nach kardialer Ischämie, bei linksventrikulärer Hypertrophie und auch bei Hypertonie (Choi et al., 1997; Gros et al., 1997; Penela et al., 2006). So korreliert die Erhöhung der GRK2-Expression in Tiermodellen mit der fortschreitenden Verschlechterung der kardialen Kontraktilität und der

$\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit (Penela et al., 2006). Zunächst scheint die Herabregulation der  $\beta$ AR ein protektiver Mechanismus zu sein, der das Herz gegen die überschießende sympathische Stimulation beschützt (Liggett et al., 2008). Außerdem sind es die  $\beta$ AR Signalwege selbst (siehe die PKA unabhängige Aktivierung der CaMKII über Epac, als Resultat einer chronischen  $\beta_1$ -Aktivierung), die kardiale Umstrukturierung verursachen können (R. Zhang et al., 2005; Sucharov et al., 2006).

Die veränderte Expression der SERCA2, des NCX und des S100A1 hat direkten Einfluss auf den Calciumtransienten. Durch die Verringerung der SERCA2 kommt es zum verminderten Rücktransport von Calcium in das SR während der Systole. Um das Calcium trotzdem aus dem Zytosol zu entfernen, steigt die Expression und Aktivität des NCX an (Marks, 2013). Zusätzlich ist auch die Expression des S100A1 verringert. S100A1 ist ein Calciumsensor, der mit der SERCA2, LTCC und RyR2 interagiert und die Calciumströme in das Zytosol und den Calciumtransport in das SR verstärkt (Most et al., 2001; Pleger et al., 2007). Aus diesen Mechanismen folgen eine geringere SERCA2-Aktivität und eine niedrigere Calciumbeladung des SR, wodurch auch die Kontraktionskraft in der Systole verringert wird. Der primäre Grund für die Herabregulation ist das Einsparen von Energie im Zuge der metabolischen Neustrukturierung (Kehat und Molkenstin, 2010). Letztlich führt dieser adaptive Mechanismus jedoch zum Verlust der kardialen Pumpfunktion.

Die gesteigerte Expression und Aktivität der PKA und CaMKII haben durch ihre zentralen Positionen in  $\beta$ -adrenergen Signalwege vielfältige Auswirkungen. In diesem Abschnitt soll ein besonderes Augenmerk auf die beiden Calciumkanäle LTCC ( $Ca_v1.2$ ) und RyR2 gelegt werden, da ihre Phosphorylierung mit der Entstehung von Arrhythmien und dem dadurch verursachten Zelltod in Verbindung stehen (Chen et al., 2005; Wehrens et al., 2006; Grueter et al., 2007; Koval et al., 2010).

Wie in Abbildung 1.4 gezeigt, können die beiden Kinasen verschiedene Aminosäurereste des RyR2 und LTCC phosphorylieren. Beim RyR2 sind die zentralen Phosphorylierungsstellen das Serin2814, Serin2808 und S2030. Der Begriff der Hyperphosphorylierung (d.h. min. drei der vier RyR-Monomere liegen phosphoryliert vor) beschreibt dabei den kritischen Status, der die Offenwahrscheinlichkeit erhöht und zu diastolischen Calciumlecks führt (Morimoto et al., 2009; Fischer et al., 2013; Niggli et al., 2013). Lange wurden die Effekte der  $\beta$ -adrenergen Stimulation des RyR2-Stroms über die Phosphorylierung an S2808 durch die PKA erklärt. Dadurch sollte die Abdissoziation von Calstabin2 (FKBP12/12.6), einem Protein, das die geschlossene Konformation des Kanals stabilisiert, ausgelöst werden (Ono et al., 2000; Doi et al., 2002; Blayney et al., 2010). Mit der

Entdeckung einer weiteren Phosphorylierungsstelle der PKA an S2030 wurde dieses Modell in Teilen verworfen und ist bis heute kontrovers diskutiert (Bers, 2006). Beständige Erkenntnisse sind jedoch, dass: (a) die CaMKII an S2814 phosphoryliert, (b) die PKA hauptsächlich an S2030 phosphoryliert, (c) die S2808 eine Phosphorylierungsstelle mit hoher basaler Phosphorylierung ist, die von diversen Kinasen (CaMKII, PKA, PKG) phosphoryliert werden kann, (d) es über die Phosphorylierungsstellen zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit und damit zu verstärkter Kontraktion kommt, (e) die Hyperphosphorylierung des RyR2 Calciumlecks verursacht, die zu einer weiteren Abnahme des SR-Calciumgehalts führen und diastolische Depolarisationen auslösen können, welche wiederum über den NCX Arrhythmien auslösen (Hain et al., 1995; Maier et al., 2003; Wehrens et al., 2004; Bers, 2006; Ferrero et al., 2007; Kushnir und Marks, 2010; van Oort et al., 2010).

Auch der LTCC wird von CaMKII und PKA phosphoryliert. Der LTCC besteht aus einer  $\alpha$ -Einheit, die die Kanalpore bildet und einer regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit. Die Phosphorylierungsstelle der  $\alpha$ -Einheit wirkt sich auf die Autoinhibition durch den C-Terminus aus. Aber auch Phosphorylierungen an der  $\beta$ -Untereinheit haben Auswirkungen auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Ähnlich wie beim RyR2 sind die Funktionen der einzelnen Phosphorylierungsstellen umstritten. Die PKA phosphoryliert die  $\alpha$ -Einheit an Serin 1700 und Threonin 1704 sowie an Serin 1928. Die Phosphorylierungen sind weitestgehend von AKAP (*A-kinase anchoring protein*) vermittelt und unterliegen durch ihre gleichzeitige Assoziation mit der PP1 einer sehr dynamischen Regulation während der elektromechanischen Kopplung. Die Phosphorylierungen durch die PKA sind dadurch zuständig für die akute  $\beta$ -adrenergisch vermittelte Steigerung der LTCC-Ströme (Hulme et al., 2006; Lemke et al., 2008; Y. Fu et al., 2013).

Im Gegensatz zur PKA hat die CaMKII-Phosphorylierung keinen direkten Effekt auf den Calciumtransienten, sondern verursacht eher eine Erleichterung der wiederholten Öffnung (Pitt, 2007; Grueter et al., 2008). Dies äußert sich in einer beschleunigten Wiedererregbarkeit (*recovery*) nach Inaktivierung. Der Effekt der CaMKII scheint im ersten Moment eher gering zu sein, wird jedoch durch den Calcium-induzierten Calciumeinstrom aus dem SR amplifiziert (Maier und Bers, 2002). Vor allem bei gesteigerter Herzfrequenz ist es von großer Bedeutung und trägt zu der gesteigerten Inotropie während sportlicher Belastung bei (Ross et al., 1995). Der Mechanismus dieses Effekts wird durch Phosphorylierungen an der  $\alpha$ -Einheit an Serin 1512 und Serin 1570 sowie durch die Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit an Threonin 498 verursacht. Die Aktivierung der CaMKII am LTCC wird durch die Kolokalisation mit  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin gewähr-



leistet, die auch als Kofaktoren der LTCC-Aktivierung fungieren. Untersuchungen in transgenen Tieren, die eine konstitutiv aktive CaMKII überexprimieren, zeigten ein arrhythmogenes Potential der CaMKII vermittelten Phosphorylierungen, durch die frühe Nachdepolarisationen verursacht werden (A. Singh et al., 2006).

So sind der LTCC und RyR2 wichtige Mediatoren der durch einen chronischen sympathischen Tonus verursachten Arrhythmien. Dies wird auch als ein Mechanismus der apoptotischen Wirkung der  $\beta_1$ AR-Aktivierung gesehen (Marks et al., 2002; Wang et al., 2004).

### **Veränderungen der kontraktilen Einheiten und der Kardiomyozyten-Struktur**

Neben der schon genannten Erweiterung der kontraktilen Einheiten, durch exzentrische oder konzentrische Hypertrophie, verändert sich auch die Zusammensetzung der kontraktilen Einheiten. Es kommt zu einer Verschiebung der Expression hin zu fetalen Strukturen. So wird die in murinen adulten Herzen vorherrschende  $\alpha$ -Myosin schweren Kette (*Myosin heavy chain*,  $\alpha$ -MHC) von der  $\beta$ -Myosin schwere Kette ( $\beta$ -MHC) ersetzt. Zusätzlich kommt es zur Expression der embryonalen Form der Myosin leichten Kette 2 (*Myosin light chain*, MLC2) (Swynghedauw, 1999; Kehat und Molkenin, 2010).

Eine weitere Veränderung betrifft die Kardiomyozytenstruktur. Die Membran in adulten Myozyten ist durch t-Tubuli gekennzeichnet. Diese bilden sich in der Anfangszeit des fetalen Wachstums und vermitteln die direkte Kopplung eines LTCC in der Kardiomyozytenmembran und eines RyR2 in der SR-Membran durch die unmittelbare Nähe der beiden Kanäle in den t-Tubuli. Dadurch gewinnt das SR als Calciumquelle der Kontraktion eine größere Bedeutung. Die t-Tubuli sind eher labil und die Proteine, die diese Struktur aufrechterhalten sind noch nicht endgültig erforscht. In dem Zusammenhang der Herzinsuffizienz verlieren die verantwortlichen Proteine ihre Funktionalität und es kommt zur partiellen Auflösung der t-Tubuli, sodass die elektromechanische Kopplung bzw. die Weiterleitung des Calcium-induzierten Calciumstroms geschwächt wird. Auch dies trägt zur reduzierten Pumpfunktion des Herzens in der Herzinsuffizienzentwicklung bei (Brette und Orchard, 2003; Orchard und Brette, 2008).

#### **1.3.3 Therapeutische Angriffspunkte**

Viele Versuche, die Kontraktilität und Erregbarkeit durch Steigerung der  $\beta$ -adrenergen Signalwege des Herzens wiederherzustellen, hatten fatale Auswirkungen. Die Folgen einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Aktivierung durch Isoprenalin oder Dobutamin sind eine

Verschlimmerung der Herzinsuffizienz (McMurray et al., 2012; Tacon et al., 2012) und so wird die Langzeit-Isoprenalingabe in der kardiovaskulären Forschung auch als Hypertrophiemodell verwendet, da eine achtwöchige Stimulation zu den typischen Symptomen der Herzinsuffizienz führt (Shan et al., 2010). Auch die Erhöhung der Signalkomponenten, die den  $\beta$ AR unmittelbar nachgeschaltet sind, hatte ähnlich verheerende Konsequenzen. Dazu gehören (a) die Inhibition der Phosphodiesterase III zur Erhöhung der cAMP-Level (McMurray et al., 2012), (b) die Steigerung der PKA- und CaMKII-Aktivität um die elektromechanische Kopplung zu verbessern (Antos et al., 2001; T. Zhang et al., 2007; Sag et al., 2009), (c) die Inhibition der PP1 zur Erhöhung der PKA und CaMKII vermittelten Phosphorylierungen (El-Armouche et al., 2008; Wittköpper et al., 2011).

Im Gegensatz dazu stellte sich die Verstärkung der Proteine, deren Expression während der Ausbildung der Hypertrophie reduziert wird bzw. die Inhibition der Proteine, deren Expression gesteigert wird, als vielversprechendere Angriffspunkte heraus. Die SERCA2-Funktion bildet dabei einen Knotenpunkt, aus dem einige therapeutische Strategien entwickelt werden konnten. Eine Verbesserung der Herzfunktion und protektive Effekte konnten durch die Deletion des SERCA2-Inhibitors PLN, die Reexpression des S100A1-Proteins sowie auch die Reexpression der SERCA2 selbst erzielt werden. Die Grundlage der positiven Effekte sind die Wiederherstellung der elektromechanischen Kopplung und SR-Beladung (Most et al., 2001; Slack et al., 2001; Pleger et al., 2007; Greenberg et al., 2014).

Ein weiterer Angriffspunkt ergibt sich aus dem Zusammenspiel der herabregulierten  $\beta$ AR und der erhöhten Expression der GRK2. Der daraus resultierende Verlust der Erregbarkeit des Herzens trägt zu der erschwerten Behandlung der Herzinsuffizienz bei. Aus diesem Grund wurden (a) die Deletion der GRK2 (Lymperopoulos et al., 2010), (b) die Inhibition durch den  $\beta$ ARK-C-Terminus, der die Translokation zur Membran durch das Abfangen der  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten verhindert (Rockman et al., 1998; Harding et al., 2001; Rengo et al., 2009; Volkers et al., 2011) und (c) Paroxetin als Inhibitor der katalytischen GRK2-Aktivität, untersucht (Thal et al., 2012) und zeigten protektive Effekte in verschiedenen kardialen Krankheitsmodellen.

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

RKIP ist in der Lage  $\beta$ -adrenerge Signale zu verstärken. Diese Arbeit sollte die Effekte einer gesteigerten RKIP-Expression auf die  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion detailliert beschreiben. Dies beinhaltet die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von RKIP auf die GRK2 und der den  $\beta$ AR nachgeschalteten Signalen. Auf molekularer Ebene wurde die Aktivität und Expression von Schlüsselkinasen und -phosphatasen sowie von Kanälen und Transportern, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind, untersucht. Über funktionelle Parameter wie das *Calcium-Cycling* und das Kontraktionsvermögen sollte die kontraktile Funktion bewertet werden.

Durch echokardiografische, elektrokardiografische, histologische und biochemische Verfahren sollten die Effekte einer gesteigerten RKIP-Expression auf die kontraktile Funktion und die strukturellen Veränderungen in der Herzinsuffizienzentwicklung bewertet werden. Eine Herzinsuffizienz wurde mittels chronischer  $\beta$ -adrenerger Aktivierung und Nachlasterhöhung über die transversale Aortenkonstriktion induziert. Durch eine  $\beta$ AR-Subtyp-spezifische Untersuchung von RKIP-transgenen Mäusen sollte die Funktionen der einzelnen Rezeptoren differenziert untersucht werden.

In einem Gentherapiemodell sollte das therapeutische Potential der RKIP-vermittelten Effekte mittels Adeno-assoziiertem Virus des Serotypen 9 (AAV9) validiert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-Adenosintriphosphat (ATP)	Hartmann Analytik, BS
2, 3 Butandion-monoxim (BDM)	Sigma Aldrich, Steinheim
5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma Aldrich, Steinheim
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
Benzamidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin Frakt. V (BSA)	Applichem, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Frankfurt
Diethyldicarbonat (DEPC)	Applichem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Applichem, Darmstadt
Direct red 80	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Entwickler	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Applichem, Darmstadt
Eukitt <sup>®</sup>	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fixiererflüssigkeit	Sigma Aldrich, Steinheim
Fura-2-acetoxymethylester	Invitrogen, Frankfurt
Glycin	Applichem, Darmstadt
HCl, rauchend 37%	Merck, Darmstadt

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Isoproterenol Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kollagenase A	Roche, Mannheim
Kollagenase D	Roche, Mannheim
Kollagenase Typ 2 (323U/mg)	Worthington, Lakewood
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Applichem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma Aldrich, Steinheim
Nonident P40	Applichem, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Pertussis Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim
Pikrinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
ProteinmarkerIII (farbig)	PEQLAB, Erlangen
RNase-freie DNase	QIAGEN, Hilden
Roti <sup>®</sup> -Histol	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Load 1	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel <sup>®</sup> 30	Roth, Karlsruhe
Taurin	Sigma Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Trypsin	PAN-Biotech, Aidenbach

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween-20	Applichem, Darmstadt
Vitamin B12	Sigma Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Kits

**Tabelle 2.2:** Liste der verwendeten Kits

Kit	Einsatz	Hersteller
ABC Vecstatin elite Kit	Immunhistochemie	Biozol
RNeasy Mini Kit	RNA-Extraktion	Peqlab
BCA	Proteinbestimmung	Thermo Scientific
ECL-plus™	Detektion	Thermo Scientific
cAMP-RIA	cAMP-Konzentration	Beckmann & Coulter, Krefeld
Superscript™	Reverse Transkription	Invitrogen, Frankfurt
Sso Fast™ EvaGreen	rtPCR	Santa Cruz

### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 2.3:** Oligonukleotidsequenzen zur Verwendung in der rtPCR

Primer	Sequenz
GAPDH for	5' TGGCAAAGTGGAGATTGTTG 3'
GAPDH rev	5' CATTATCGGCCTTGACTGTG 3'
NPPB forward primer	5' GGATCGGATCCGTCAGTCGTT 3'
NPPB reverse primer	5' AGACCCAGGCAGAGTCAGAAA 3'
NPPA forward primer	5' ACAGATCTGATGGATTTCAAGAACCTG 3'
NPPA reverse primer	5' AGTGCGGCCCTGCTTCCTCA 3'
COL3A1 forward primer	5' AAACAGCAAATTCACCTTACAC 3'
COL3A1 reverse primer	5' ACCCCCAATGTCATAGG 3'

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Antikörper

<b>Primäre Antikörper</b>			
<b>Antikörper</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Wirt</b>
pRKIP (pSer153)	1:4000	Santa Cruz,	Kaninchen
RKIP	1:5000	eigene Herstellung (Lorenz et al., 2003)	Kaninchen
pAkt (T308)	1:2000	Cell Signaling, 244F9	Kaninchen
Akt2	1:1000	Cell Signaling, 2964	Kaninchen
p $\beta_2$ AR (S355/S356)	1:1000	Santa Cruz, sc-22191	Kaninchen
pCaMKII (T286)	1:2000	Thermo Scientific, MA1-047	Maus
pCaMKII (T286); für die Detektion des pCa $\nu$ $\beta$ (T498) (Grueter et al., 2008)	1:4000	Thermo Scientific, MA1-047	Maus
pCa $\nu$ 1.2 (S1928)	1:1000	Badrilla, A010-70	Kaninchen
Ca $\nu$ 1.2	1:500	Alomone labs, ACC-003	Kaninchen
CD31	1:50	Santa Cruz, sc-28188	Kaninchen
pERK1/2 (T202/Y204)	1:1000	Cell Signaling, 9101	Kaninchen
ERK1/2	1:1000	Cell Signaling, 9102	Kaninchen
pDARPP32 (T34); für die Detektion des pI-1 (T35) (El-Armouche et al., 2004)	1:750	Cell Signaling, D27A4	Kaninchen
pEzrin (T567)/Radixin (T564) /Moesin (T558)	1:1000	Cell Signaling, 3141	Kaninchen
G $\beta$	1:10000	Santa Cruz, sc-378	Kaninchen
NCX	1:1000	Swant, $\pi$ 11-13	Maus
PP1	1:1000	Millipore, 07-1218	Kaninchen
pRyR2 (S2808)	1:5000	Badrilla, A010-30	Kaninchen
pRyR2 (S2814)	1:5000	Badrilla, A010-31	Kaninchen
RyR2	1:5000	Thermo Scientific, 34C	Maus
SERCA2	1:10000	Santa Cruz, sc-8095	Ziege



Sekundäre Antikörper HRP-konjugiert			
Antikörper	Einsatz	Hersteller	Wirt
Kaninchen	1:7000	Dianova	Ziege
Maus	1:7000	Dianova	Ziege
Ziege	1:5000	Santa Cruz	Esel

### 2.1.5 Biologisches Material

#### Adenoviren

**Tabelle 2.6:** Liste der verwendeten Adenoviren

Bezeichnung	Spezies	Bemerkung	Herkunft
AdV-Flag-RKIP	Ratte	N-terminaler Flag-Tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
AdV-Flag-RKIP <sup>S153A</sup>	Ratte	N-terminaler Flag-Tag	K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg
AdV-eGFP	Qualle		T. Stiewe, Marburg
AdV-LacZ	<i>E. coli</i>		K. Lorenz, Pharmakologie, Würzburg

#### Adeno-assoziierte Viren des Serotyp 9

**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Plasmide zur Kotransfektion mit pDP9rs und p5E18-VD2-9 zur Bildung der AAV9-Vektoren

Bezeichnung	Spezies	Bemerkung	Herkunft
pdsCMV-MLC0.26-Myc-RKIP	Ratte	N-terminaler Myc-Tag	O. Müller, Heidelberg
pdsCMV-MLC0.26-eGFP	Qualle		O. Müller, Heidelberg

## Mauslinien

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Mauslinien

Bezeichnung	Name	Hintergrund	Herkunft
$\alpha$ Mhc-Pebp1 Linie #4	RKIP-tg#4	FVB/N	K. Lorenz, Würzburg
$\alpha$ Mhc-Pebp1 Linie #13	RKIP-tg#13	FVB/N	K. Lorenz, Würzburg
$\alpha$ Mhc-Pebp1 <sup>S153A</sup> #10	RKIP <sup>S153A</sup>	FVB/N	K. Lorenz, Würzburg
Adrb1 <sup>-/-</sup>	$\beta_1$ KO	FVB/N	B. K. Kobilka, Rohrer et al., 1996
$\alpha$ Mhc-Pebp1/Adrb1 <sup>-/-</sup>	RKIP/ $\beta_1$ KO	FVB/N	Kreuzung, K. Lorenz, Würzburg
Adrb2 <sup>-/-</sup>	$\beta_2$ KO	FVB/N	B. K. Kobilka, Chruscinski et al., 1999
$\alpha$ Mhc-Pebp1/Adrb2 <sup>-/-</sup>	RKIP/ $\beta_2$ KO	FVB/N	Kreuzung, K. Lorenz, Würzburg
$\alpha$ Mhc-Pebp1#4	RKIP-tg	C57Bl/6J	Kreuzung, K. Lorenz, Würzburg
Pebp1 <sup>-/-</sup>	RKIP-KO	C57Bl/6J	Pebp1 <sup>+/-</sup> (MMRRC), Kreuzung, K. Lorenz, Würzburg

## 2.2 Methoden

Teile der Methoden wurden aus der von mir angefertigten Diplomarbeit mit dem Titel „Einfluss von RKIP auf die Regulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren“ übernommen.

### 2.2.1 Experimentelle Tiermodelle

#### Transversale Aortenkonstriktion

Der Eingriff zur Erhöhung der Nachlast wurde an männlichen Tieren im Alter von 8 Wochen durchgeführt. Dieser Operation wurden Wt und RKIP-tg im FVB/N, C57BL/6J Hintergrund so wie im  $\beta_1$ KO- und  $\beta_2$ KO-Hintergrund unterzogen. Durch die Verringerung des Aortendurchmessers auf den Durchmesser einer 27-Gauge Kanüle wurde ein chronischer linksventrikulärer Überdruck induziert (Lorenz et al., 2009). Der Eingriff wurde von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. Die Dauer der Maßnahme betrug 6 Wochen bei FVB/N und  $\beta$ KO-Tieren, 3 Wochen bei C57BL/6J-Mäusen und 4 Wochen im Gentherapieversuch mit Wt C57BL/6J-Tiere und RKIP-KO-Tieren. Die Gesundheitszustand der Tiere wurde engmaschig beobachtet. Die Mäuse wurden vor dem Eingriff und am Tag der Organentnahme echokardiografisch untersucht. Grundlegende Parameter wurden durch das Wiegen der Herzen erhalten. Für die histologische und biochemische Untersuchung wurden Herzteile in 4%Paraformaldehyd fixiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Ein wichtiger Parameter, der den Erfolg der Konstriktion anzeigt, ist der Druckgradient der über den Faden hinweg am Aortenbogen gemessen wird. Tiere bei denen der Gradient unter 60mmHg lag, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### Einbau des osmotischen Langzeit-Injektionssystems (Mini-Pumpe)

Um den Effekt von RKIP bei dauerhafter Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren zu untersuchen, wurden Wt und RKIP-tg C57BL/6J Mäusen osmotische Minipumpen mit Isoproterenol (30mg/d/kg Körpergewicht) für eine Dauer von 28d eingesetzt. Für die Versuche wurden *Alzet<sup>®</sup> micro-osmotic pumps* vom Modell 1004 benutzt. Diese arbeiten nach dem Prinzip der Osmose (Theeuwes und Yum, 1976). Die äußerste Schicht der Pumpe bildet eine semipermeable Membran durch die nur Wasser diffundieren kann. Sie umgibt das „*osmotic driving agent*“, das ein hohes osmotisches Potential besitzt und so den Einstrom von Wasser bewirkt. Dieser Einstrom führt zu einer Druckerhöhung im Reservoir, in dem sich der gelöste Stoff befindet, und drückt ihn so durch ein dünnes

Rohr (*Flow modulator*) nach außen. Nach Implantation in eine Maus bedeutet dies eine kontinuierliche subkutane Applikation.

Die Konzentration der Ausgangslösung (Cd) konnte mittels der Formel  $k_0 = Q \times Cd$  berechnet werden. Dabei entspricht Q der Abgaberate der Pumpe. Diese ist Modell und chargenspezifisch und beträgt bei den verwendeten Pumpen 0,1vl/h.  $k_0$  stellt die gewünschte Abgabemenge pro Zeit da. In diesem Fall sollten 30 mg/kg/d verabreicht werden. Aus diesen Werten erhält man mit Hilfe der oben angegebenen Formel und des Körpergewichts der Mäuse die Konzentration der anzusetzenden Ausgangslösung in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die benötigte Menge Isoproterenol wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und die Pumpen damit beladen. Zur Equilibrierung wurden die befüllten Pumpen über Nacht in isotonischer Kochsalzlösung bei 37°C gelagert. Kurz vor der Implantation wurden die Pumpen drei Mal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Mäuse wurden vor dem Einbau und am Tag der Organentnahme echokardiografisch untersucht. Die Implantation der Pumpen erfolgte durch Prof. Dr. Kristina Lorenz.

### **Injektion des AAV9-Virus**

Die AAV9-Vektoren wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Müller erstellt. Dazu wurde der offene Leserahmen des RKIP mit einem Myc-*Tag* amplifiziert und über spezifische Primer mit einer Kozak-Sequenz und einer BamHI-Schnittstelle am 5' Ende und einer BsrGI-Schnittstelle am 3' Ende versehen. Das Produkt wurde in einen selbst-komplementären AAV9-Vektor-Plasmid pdsCMV-MLC0.26-eGFP kloniert, um den pdsCMV-MLC0.26-RKIP-Vektor zu erhalten. Über eine Kotransfektion der Vektoren pdsCMV-MLC0.26-eGFP (diente als Kontrolle der Virusapplikation) bzw. pdsCMV-MLC0.26-RKIP zusammen mit dem p5E18-VD2-9-Plasmid für pDP9rs ein Derivat des pDP2rs, das mitunter für das AAV9-Kapsen-Gen codiert wurden die Vektoren erstellt. Sie wurden nach 48h geerntet und mit einer Iodixanol-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Vektoren wurden per real-time PCR quantifiziert. Nähere Einzelheiten zur Herstellung und Aufreinigung sind den Publikationen Schmid et al., 2015 und Pleger et al., 2011 zu entnehmen. Die AAV9 Vektoren wurden während der TAC-Operation als ein 150  $\mu\text{l}$  Bolus mit einer Gesamtviruspartikelzahl von  $1 \times 10^{12}$  *i.v.* in die Schwanzvene injiziert (Prof. Dr. Kristina Lorenz).

### **Einbau des ETA-F10 Transmitters und Aufzeichnung von EKG-Spuren**

Zur Aufzeichnung der EKG-Spuren wurden ETA-F10 Transmitter (Data Science International, DSI) verwendet. Die Implantation der Sender erfolgte in der Lead-II-Position

durch Prof. Dr. Kristina Lorenz in 10–12 Wochen alten Männchen. Die EKG-Signale wurden über Empfängerplatten (Data Science International) und einen Analogwandler an die DEM (*Data Exchange Matrix*) Einheit übermittelt, die an einen Computer angeschlossen war. Zur Aufnahme und Auswertung der Signale wurde die Software Labchart 7 (Chart 5.4, ADInstruments) benutzt. Zunächst wurde eine Messung über 24h erstellt. Durch die intraperitoneale Gabe von 50 µg oder 100µg Isoprenalin (entspricht 1,5mg/kg oder 3mg/kg Körpergewicht; *i.p.*, Prof. Dr. Kristina Lorenz) wurden Arrhythmien ausgelöst und die Messung für weitere 24h fortgesetzt. Die Auswertung erfolgte durch Klassifizierung der EKG-Ausschläge unter basalen Bedingungen wie auch 2h nach Arrhythmieinduktion und die Anzahl der Extrasystolen pro Stunde als Maß der Arrhythmieeinigung verwendet. Dabei wurde die ersten 10min ausgespart um verfälschte Ergebnisse durch die Aufregung der Tiere während des Verstellens der Käfige und der Injektion zu vermeiden. Als ektopische Ausschläge bzw. Extrasystolen wurden diejenigen gezählt, die außerhalb des Rhythmus stattfanden und keine reguläre PQRST-Form zeigten. Diese waren vor allem durch verstärkte und entgegengesetzt gerichtete Ausschläge charakterisiert. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Peter Nordbeck und Prof. Dr. Kristina Lorenz.

### **Echokardiografische Untersuchungen**

Die echokardiografischen Untersuchungen wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt. Mit einem Vevo 770, einem hochauflösenden Ultraschallgerät für Kleintiere (VisualSonics), das mit einem 30-MHz Ultraschallkopf (RMV-707B) ausgestattet war, wurden transthorakale Echokardiogramme erzeugt. Die Wanddicken des Septums und der Hinterwand und der enddiastolische und endsystolische linksventrikuläre Innendurchmesser (LVIDED und LVIDES) wurden im M-Modus der kurzen Achse (transversal) des Herzens ermittelt. Für die kurze Achse wurde eine Einstellung am proximalen Ende der Papillarmuskeln gewählt. Die Verkürzungsfraction ( $FS=fractional\ shortening$ ) ist ein Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität. Sie kann mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Verkürzungsfraction[\%]} = ((\text{LVIDED}-\text{LVIDES}) / \text{LVIDED}) \times 100.$$

Anschließend wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und gewogen (*body weight, BW*). Das Herz wurde entnommen und gewogen (*heart weight HW*). Im Anschluss wurden die Herzen auf der Ebene der Papillarmuskeln geteilt und die obere Hälfte für die histologischen Untersuchungen in 4%igem Formalin fixiert. Die Herzspitze wurde in

zwei Teile geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Nutzung der Herzen wurden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **PTX-Behandlung**

PTX führt zur ADP-Ribosylierung von  $\text{G}\alpha_i$  und damit zur Inaktivierung von  $\text{G}\alpha_i$ . PTX wird von dem Bakterium *Bordetella Pertussis* produziert, dem Erreger des Keuchhustens. Es ist ein hexameres Protein, das aus einem A-Protomer (S1- Untereinheit) und einem B-Oligomer (zwei Dimere aus S2-S4- und S4-S3- Untereinheiten verbunden durch eine S5-Untereinheit) besteht, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das A-Protomer besitzt ADP-Ribosyltransferase-Aktivität. Das bedeutet, dass es die Übertragung von ADP-Ribose aus endogen in der Zelle vorkommendem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) auf ein Protein katalysiert. Im Fall des PTX wird ein Cystein am C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren inhibitorischen G-Proteins ADP-ribosyliert. Dadurch wird dessen Interaktion mit dem Rezeptor gestört und dessen Funktion, die Hemmung der Adenylylzyklase (AC), gehemmt (Reisine, 1990; Kaslow und Burns, 1992). Für den Versuch wurde FVB/N-Mäusen  $300\mu\text{g}/\text{kg}$  PTX intraperitoneal verabreicht und die Herzen nach 24 h entnommen.

### **2.2.2 Zellpräparation und Kultivierung von Primärzellen**

#### **Präparation adulter Kardiomyozyten**

Für die Präparation der adulten Kardiomyozyten wurden FVB/N und C57Bl/6J Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer sind im Anhang aufgelistet. Das Herz wurde entnommen und in Perfusionspuffer überführt. Die Aorta wurde vorsichtig frei gelegt und auf einer an ein Perfusionssystem angeschlossene Kanüle ( $0,45 \times 16\text{mm}$ ) fixiert. Das Herz wurde mit einer Durchflussrate von ca.  $3\text{ml}/\text{min}$  mit Perfusionspuffer durchspült. Nach 3min wurde der Verdau gestartet, indem ein mit Kollagenase A und D und Trypsin versetzter Puffer in das Herz geleitet wurde. Die Dauer des Verdau betrug 6min. Durch das Wechseln des Puffers auf einen FCS-haltigen Stopppuffer wurde der Verdau abgeschlossen. Das Herz wurde von der Kanüle genommen, die Vorhöfe entfernt und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Die Zellsuspension wurden über ein Netz (Porengröße  $200\mu\text{m}$ ) gefiltert. Nach Absetzen der Zellen wurde der Puffer entfernt und durch neuen Stopppuffer ersetzt. Nun wurde die Calciumkonzentration des Puffers schrittweise (im Abstand von 4min wurden erst 10, 20, 30 und zuletzt  $40\mu\text{l}$  einer  $100\text{mM}$  Calciumlösung zugefügt) auf  $1\text{mM}$  erhöht.

Nach Absetzen der Zellen wurde der Überstand entfernt und die Zellen in frischem 1mM Calciumpuffer resuspendiert. Für die Analyse der PKA-Aktivität wurden die Zellen anschließend in Kardiomyozytenmedium resuspendiert, ausgesät und vor der Analyse der PKA-Aktivität 30min ruhen gelassen.

### **Präparation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten und Fibroblasten**

Für die Präparation neonataler Kardiomyozyten (NRKM) wurden die Herzen von 1-3 Tage alten Ratten entnommen und in gekühlten CBFHH-Puffer überführt. Nach dem Entfernen von Geweberesten und Herzohren wurden die Herzen in vorgewärmter CBFHH-Lösung (s. Anhang) mit Trypsin zerkleinert und in einem Becherglas für 5min bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, der vor allem Blutzellen und Zelltrümmer enthält, abgenommen und verworfen. Die Herzen wurden dann wieder mit frischer Trypsinlösung für 10min bei RT unter Rühren inkubiert. Die Zellen wurden resuspendiert und der Überstand in ein Falcon mit 7,5 ml FCS überführt, um den Verdau zu stoppen. Dieser Schritt wurde weitere sechs mal wiederholt um das Gewebe weiter zu verdauen. Die in FCS abgestoppten Überstände der einzelnen Verdauungsschritte wurden für 5min bei 800rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in Medium 1 (s. Anhang) resuspendiert und in einem Falcon vereinigt. Im nächsten Schritt wurden größere Zellklumpen durch ein Sieb abgetrennt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Anteil mesenchymaler Zellen noch sehr hoch. Das Ziel der Präparation ist es eine möglichst hohe Anzahl an Herzmuskelzellen zu erhalten. Aus diesem Grund wird im „*Pre-Plating*“ ausgenutzt, dass sich die mesenchymalen Zellen schneller an die Zellkulturschale anheften als die Herzmuskelzellen. Für das „*Pre-Plating*“ wurden die Zellen auf 10cm-Zellkulturplatten ausgesät und für 60min im Brutschrank belassen. Im Anschluss wurden die Zellen in einem Becherglas vereinigt und die Platten mit Medium 2 (s. Anhang) vorsichtig abgespült. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Rosenthal-Zählkammer und eine 1:2 Verdünnung mit Trypanblau benutzt. In der Rosenthal-Zählkammer entspricht ein Großkästchen (enthält 4x4 kleine Kästchen) einem Volumen von 200 $\mu$ l (1mm x 1mm x 0,2mm). Die Zellen wurden in Medium 2 auf die entsprechende Konzentration verdünnt und  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well auf Polylysin-beschichtete 12 Well-Platten ausgesät. Nach 24h wurde das Medium auf Medium 3 gewechselt und nach weiteren 24h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen transduziert. Zur Transduktion wurde der Virus in einer  $1:5 \times 10^4$  oder  $1:1,6 \times 10^4$  Verdünnung auf die Zellen gegeben. Der Virus wurde nach 24h entfernt und auf Medium 4 gewechselt. Die Zellen wurden kontinuierlich bei 37°C und 1% CO<sub>2</sub>

gehalten. In Medium 2-4 ist BrdU enthalten um die Proliferation der Fibroblasten zu verhindern. Die Präparation der NRKM erfolgte durch die technische Assistentin Nadine Hemmrich.

Die im Schritt des „*Pre-Plating*“ auf den Zellkulturplatten verbliebenen Zellen stellten die Fibrblastenkultur dar. Diese wurden mit DPBS gewaschen und in Fibroblastenmedium (siehe Anhang) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Bei der Passagierung wurden die Zellen durch eine 5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA von der Platte abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zentrifugation (130xg, 5min) entfernt und die Zellen in der Neubauer-Zellkammer gezählt. Für den Thymidineinbau wurden 15000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Fibroblasten konnten bis einschließlich Passage drei verwendet werden. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit einer 1:3,3x10<sup>4</sup> Verdünnung transduziert und nach 24 h auf Medium ohne FCS gesetzt.

### 2.2.3 Untersuchung zellulärer Kaskaden in Kardiomyozyten

#### Bestimmung der PKA-Aktivität

Zur Analyse der PKA-Aktivität wurden NRKM, die mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen transduziert wurden nach 24h in FCS-depletierten Medium für 10 min mit 10nM Isoprenalin bei 37°C stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Anwesenheit von 100µM des PDE-Inhibitors 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Die Zellen wurden in kaltem Phosphorylierungspuffer mit IBMX lysiert und sonifiziert. Zelltrümmer und die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (25200xg; 10min, 4°C) abgetrennt.

Mit den adulten Kardiomyozyten wurde ähnlich verfahren sie wurden in Phosphorylierungspuffer 2 in Anwesenheit von 100µM IBMX lysiert, sonifiziert und zentrifugiert (25200xg; 10min, 4°C). Die PKA-Kinase Aktivität wurde mittels einer PKA-spezifischen Phosphorylierungstelle am Phosducin (Phd) analysiert. Dafür wurde aufgereinigtes Phosducin (Phosducin-His6) mit den Zelllysaten [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP mit MgCl<sub>2</sub> für 30min bei 30°C inkubiert. Die folgende Auflistung zeigt die genaue Zusammensetzung der Ansätze.

50µg NRKM	30µg adulte KM
20mM HEPES (pH7,2)	
2mM EDTA	
10mM MgCl <sub>2</sub>	
5µg Phosducin/ Phosducin <sup>S73A</sup>	
1µM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	
Endvolumen 50µl	



Die einzelnen Proben wurden dann mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und das inkorporierte [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] durch Analyse mit dem PhosphoImager (Biorad) quantifiziert. Die PKA-Assays wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt.

## 2.2.4 Methoden zur histologischen Untersuchung von Herzgewebe

### Analyse der interstitiellen Fibrose mittels Sirius Rot-Färbung

Um die fibrotischen Veränderungen im Herz zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte gemacht und mit Sirius Rot gefärbt. Dafür wurde Gewebe verwendet, das in Formalin fixiert wurde. Formalin führt zur Bildung von Methylenbindungen zwischen Aminogruppen von Proteinen. Dadurch entsteht ein stabilisierendes Gerüst im Gewebe und die autolytischen Vorgänge, die nach dem Tod eintreten werden gestoppt. Für das Einbetten in Paraffin musste das Gewebe zunächst entwässert werden. Dafür wurde eine aufsteigende Alkoholreihe benutzt. Der Alkohol verdrängt das Wasser aus dem Gewebe. Anschließend musste das Gewebe von einem Zwischenmedium durchtränkt werden, das in Alkohol sowie in Paraffin löslich ist. Dafür wurde hier Xylol benutzt. Daraufhin konnte das Gewebe mit verflüssigtem Paraffin behandelt werden. Die gesamte Entwässerungsprozedur erfolgt in einer Apparatur von Sakure Tissue-Tek und erfolgte in der Pathologie der Universitätsklinik Würzburg. Das Gießen erfolgte an der Gießapparatur EG 1150H (Leica).

Anschließend wurden am Mikrotom 2 $\mu\text{m}$  dünne Gewebeschnitte erstellt. Nach dem Trocknen der Schnitte (45°C, über Nacht) konnten diese für Färbungen benutzt werden. Durch das Färben der Schnitte mit Sirius Rot, einem stark anionischen Farbstoff, werden basische Bereiche im Kollagenmolekül angefärbt. Vor der Färbung mussten die Schnitte jedoch entparaffinisiert werden. Dies geschah in drei Schritten mit dem Xylolerersatz Roti<sup>®</sup>-Histol. Daraufhin wurde das Roti<sup>®</sup>-Histol in einer absteigenden Alkoholreihe entfernt (drei Mal 100% Alkohol, ein Mal 70% Alkohol). Die Färbung erfolgte für 45min in Sirius-Rot-Färbelösung (s. Anhang). Danach wurden die Schnitte kurz in Wasser gewaschen und anschließend wieder entwässert (aufsteigende Alkoholreihe: einmal 70% Alkohol, vier Mal 100% Alkohol). Da der Alkohol ungünstige Lichtbrechungseigenschaften besitzt, folgten noch zwei Roti<sup>®</sup>-Histo-Schritte. Als Eindeckmedium wurde Eukitt<sup>®</sup> benutzt. Das Schneiden und Färben der Gewebeschnitte erfolgte durch die technische Assistentin Marianne Babl.

Die Schnitte wurden mit 5-facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte verblindet mittels Adobe Photoshop. Dazu wurden zunächst Bereiche die

kein Herzgewebe darstellten einfarbig abgedeckt. Durch die Histogrammfunktion wurde die Pixelzahl der abgedeckten Flächen bestimmt (Toleranzbreite 25) und diese von der Gesamt-Pixelanzahl subtrahiert, um die Pixelanzahl der Herzfläche zu berechnen. Für den Anteil der fibrotischen Veränderungen, wurde ein Rot-Ton gewählt, der der Färbung des fibrotischen Gewebes entspricht und auch von diesem die Pixelanzahl bestimmt (Toleranzbreite 100). Die angegebenen Werte entsprechen dem Anteil fibrotischer Veränderungen am kardialen Gewebe.

### **Bestimmung der Kapillardichte mittels Immunhistologischer Untersuchung der CD31 Expression**

Um die RKIP Expression und auch die durch CD31 markierten Kapillaren zählen zu können wurden Wt und RKIP-tg Schnitte (Lorenz et al., 2009) mittels Avidin-Biotin Komplexbildung (ABC, Vectastain elite kit) angefärbt. Dazu wurden die Schnitte zunächst in Rotihistol<sup>®</sup> entparaffinisiert und das Roti<sup>®</sup>-Histol anschließend mittels einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70% and 50%) entfernt. Mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol (30%) wurden die Membranen permeabilisiert und anschließend mit PB-Puffer gewaschen. Die Schnitte wurden dann in 10mM Citratpuffer bei 700W in der Mikrowelle gekocht um die Antikörperbindestellen wieder besser zugänglich machen zu können. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mit Wasser und Waschpuffer gewaschen. Durch 2h Inkubation bei RT mit serumhaltigem Puffer (PB-Puffer mit 0,25% (v/v) TritonX100 und 5% (v/v) Ziegen Serum) wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt. Die Antikörperbindung (anti-RKIP 1:100) erfolgte über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Ziegen-anti-Kaninchen IgG für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wiederum mit Waschpuffer gewaschen. Durch die Avidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wurde der Avidin/Biotin-Komplex vervollständigt und die Schnitte anschließend gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (Sigma). Das Signal wurde dabei durch die Peroxidase vermittelte Oxidation des Diaminobenzidins vermittelt, die zu der charakteristischen Braunfärbung führte. Die Zellkerne wurde mit Hematoxylin gegengefärbt. Nach Abschluss der Färbung und gründlichen Waschschritten wurde das Wasser durch eine steigende Ethanolreihe (50%, 70%, 90% and 100%) aus dem Gewebe verdrängt und nach einem kurzen Roti<sup>®</sup>histolbad mit Eukitt<sup>®</sup> eingebettet. Die Färbung wurde an einem Leica DM 4000B-Mikroskop mit einer 400x Vergrößerung fotografiert. Die CD31-Färbung erfolgte auf ähnliche Weise, nur wurde hier mit Pferdeserum geblockt und nach Bindung des CD31-Antikörper (1:50) mit einem biotinylierten Pferde-anti-

Kaninchen IgG inkubiert (ABC-Vecstatin elite Kit, Biozol). Diese Färbungen wurden im Institut für Physiologie der Universität Würzburg in der Gruppe von Prof. Dr. Süleyman Ergün durchgeführt.

Für die Auswertung wurden pro Herzquerschnitt wurden 12 Ausschnitte mit kompletter und klar unterscheidbarer Färbung ausgewählt. In den Feldern wurde jeder Kardiomyozyt und jede Kapillare gezählt und daraus ein Verhältnis gebildet. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der technischen Assistentin Anna-Karina Lamprecht.

### 2.2.5 Analyse des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten

Um die proliferative Antwort der Fibroblasten unter der Expression von RKIP und der phosphorylierungsdefizienten Mutante zu untersuchen wurde der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin gewählt. Durch die radioaktive Markierung des Thymidin kann die Replikation quantifiziert werden. Ein erhöhter Einbau des [<sup>3</sup>H]-Thymidin zeigt somit eine vermehrte Mitose und gibt damit Aufschluss über die Proliferation. Die transduzierten Fibroblasten wurden anschließend für 24h in Serum-depletierten Medium gehalten. Der Einbau erfolgte in 0,1% FCS (v/v) Fibroblastenmedium mit einer [<sup>3</sup>H]-Thymidinkonzentration von 1µCi. Nach 48h Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die Zellen bzw. das Protein mit 5% Trichloressigsäure (TCA) für mindestens 60 min bei 4°C gefällt. Nach 60 minütiger Inkubation mit 0,5M NaOH bei 37°C wurde die Lösung in Röhren überführt, die mit der Szintillationslösung Lumasafe™plus auf 5ml aufgefüllt wurde. Die Zählung erfolgte in einem β-Counter. Für die Auswertung wurden die einzelnen Versuchstage auf die Kontrollbedingungen, in diesem Fall die LacZ-transduzierten Zellen bezogen.

### 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

#### Herstellung von Lysaten

Die Proteinlysate aus Gewebe wurden mit TritonX100-haltigem Lysepuffer hergestellt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (10min, 1000xg, 4°C). Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Kit gemessen und für die *Western Blot* Analyse auf 2µg/µl eingestellt. Für die Untersuchung der β<sub>2</sub>AR-Phosphorylierung wurde das Gewebe mit Phosphorylierungspuffer aufgeschlossen. Die erste Zentrifugation (25,200xg; 10min, 4°C) entfernte die Zelltrümmer und die Zellkerne. Eine zweite Zentrifugation (150,000xg; 20min, 4°C) trennte die Membran-Fraktion von der zytosolischen Fraktion. Für die *Western-Blot* Analyse der β<sub>2</sub>AR-Phosphorylierung wurde die Membranfraktion

eingestellt und mit Ladepuffer versetzt.

### **Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels SDS-Page ist es möglich Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Ein wichtiger Bestandteil im Gelladepuffer, im Laufpuffer sowie im Gel ist Natriumlaurylsulfat (SDS). SDS denaturiert die Proteine und führt durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminoresten der Proteine zu einer einheitlichen negativen Ladung der Proteine, sodass die Proteine im elektrischen Feld zur Anode laufen. Als Gelmatrix dient polymerisiertes Acrylamid, das ein Netz bildet durch dessen Poren die Proteine wandern. Dabei entscheidet der prozentuale Anteil des Acrylamids über die Größe der Poren. Ein Gel besteht aus einem Sammelgel (4% Acrylamid), das die Proteine in einer Lauffront zur schärferen Auftrennung ansammelt und einem Trenngel (6-15%), in dem sich die Proteine der Größe nach auftrennen (s. Anhang).

### **2D-SDS Gelelektrophorese**

Bei der zwei dimensionalen SDS Gelelektrophorese werden zwei aufeinanderfolgende Trennungsmechanismen verwendet. Die 1. Dimension besteht aus der isoelektrischen Fokussierung für die der Anteil der geladenen Aminosäuren an der Gesamtsequenz des Proteins von Bedeutung ist. Je nach pH liegen die Carboxyl- und Aminreste protoniert oder deprotoniert vor und sind demnach geladen oder ungeladen. Der pH bei dem das Gesamtprotein ungeladen vorliegt beschreibt letztendlich den isoelektrischen Punkt. Die in der 1. Dimension verwendeten *ReadyStrip IPG strips* (pH4,7 bis pH5,9; Biorad) besitzen einen pH-Gradienten, in dem die Proteine bis zu dem Punkt zu der positiven oder negativen Elektrode wandern bis sie ungeladen vorliegen und stehen bleiben. Für die Analyse des RKIP wurden Lysate aus den linken Ventrikeln von Wt und RKIP<sup>KO</sup> Tieren wie schon beschrieben hergestellt. 2 mg des Gesamtproteins wurden mittels Methanol/Chloroform-Fällung präzipitiert um die Proben von Salz und Detergens-Resten zu befreien. Das Proteinpellet wurde in Fokusladepuffer resuspendiert. Der pH-Bereich der Strips wurde sehr eng gewählt um die ähnlichen PEBP-Isoformen zu unterscheiden und zusätzlich Aussagen über den Phosphorylierungsstatus des RKIPs treffen zu können, da zusätzliche negative Ladungen der Phosphatgruppe den isoelektrischen Punkt verändern und phosphorylierte und unphosphorylierte Populationen unterschieden werden können. Die Strips wurden mit 600µg Protein aktiv bei 50V für 12h rehydriert um die Aufnahme zu verbessern. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in 45000Vh. Anschließend wurden die Proteine auf den Strips mit DTT denaturiert und mit Iodoacetamin (IAA) alkyliert.

Die 2. Dimension verlief nach dem schon bekannten Prinzip der Größenauftrennung auf 13%-Gelen. Die gleichmäßige Beladung beider Strips wurde durch die Proteinfärbung mit Coomassie kontrolliert.

### **Proteintransfer und Immundetektion**

Für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad) verwendet. Zur Proteinauftrennung wurden die Gele in die mit 1xSDS-Puffer gefüllten Kammern überführt und mit den Proben beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 200V für ca. 1h. Nach dem Transfer wurden die untersuchten Proteine mittels Immunodetektion sichtbar gemacht. Diese Technik beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Zunächst wurden die freien Bindestellen der Membran mit einer 5%igen Magermilchlösung für 2h abgesättigt. Im Anschluss wurden die entsprechenden primären Antikörper auf die Membran gegeben und unter leichtem schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert. Dazu wurden die primären Antikörper entweder in 5%iger Magermilchlösung oder in BSA-Puffer (s. Anhang); verdünnt. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde 5x für 10min mit BSA-Puffer gewaschen. Um die spezifische Bindung der primären Antikörper an das Antigen nachzuweisen, wurde ein speziesspezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der an die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish) gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in BSA-Puffer verdünnt (1:7000). Nach zweistündiger Inkubation wurde ungebundener Antikörper 5x für 10min mit BSA-Puffer gewaschen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, die durch Belichtung eines Röntgenfilms (Super RX, Fujifilm) sichtbar gemacht werden kann. Als Substrat diente der Meerrettichperoxidase das Amersham ECL Plus™ *Western Blotting Detection Reagent*.

#### **2.2.7 Bestimmung der Kontraktionsrate in neonatalen Kardiomyozyten**

Die Kontraktionsrate von NRKM sollte Aufschluss über kontraktile Aktivität geben. Es wurden NRKM benutzt da diese Zellen im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten noch spontan kontrahieren. Durch die Transduktion der Zellen mit Adenoviren konnte so auch der Einfluss von RKIP auf die kontraktile Aktivität untersucht werden. Durch die Stimulation mit Isoprenalin wurde die  $\beta$ -adrenerge Aktivierung simuliert. Die Analyse der kontraktilen Aktivität wurde von Florian Schäfer durchgeführt. Dazu wurden

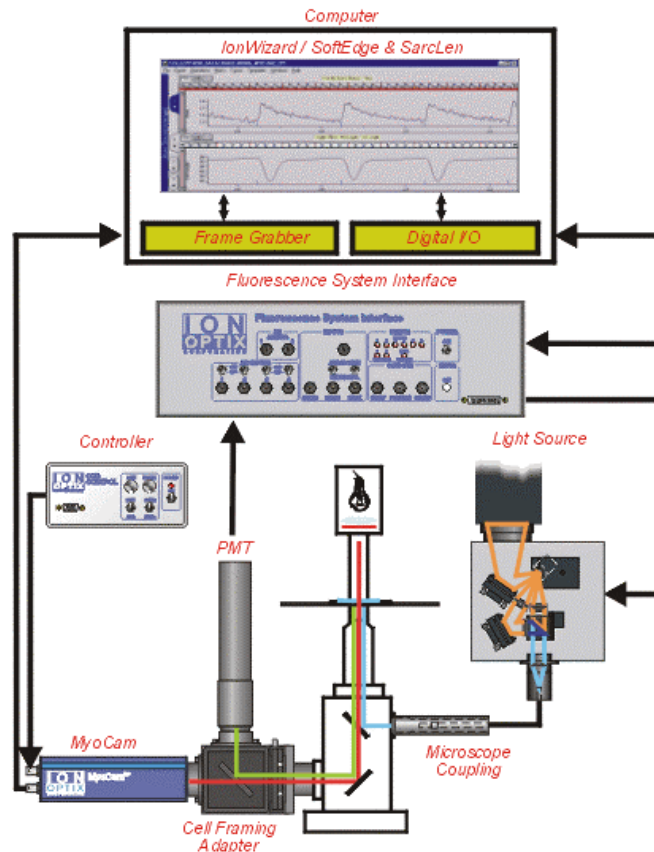
pro Versuchstag vierfach Bestimmungen mit untransduzierten und LacZ- und RKIP-transduzierten Zellen durchgeführt. An einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop wurden die Kontraktionen pro Minute bei 33°C in Medium 3 gezählt. 2 min nach der Stimulation mit 50nM Isoprenalin wurde ein weiteres Mal gezählt.

### 2.2.8 Bestimmung des Calcium-*Cycling* in Kardiomyozyten

Nach einem weiteren Pufferwechsel wurden die Zellen aufgeteilt und die erste Zellfraktion für 15min mit Fura-2-acetoxymethylester (1 $\mu$ M) beladen. Durch die Veresterung kann Fura-2 in die Zelle gelangen. Dort spalten Esterasen den Acetoxymethylester ab, sodass Fura-2 in der Zelle geladen vorliegt und nicht wieder hinausdiffundieren kann. Nach zwei Waschschritten (8min) mit 1mM Calciumpuffer wurde der Puffer auf den Messpuffer gewechselt, dessen Calciumkonzentration bei 1,2mM lag.

Die Messungen erfolgten an einem auf Videodaten-basierenden Kanten-Detektions-System, das mit einem „*dual-excitation-single-emission*“ Photomultiplier System von Ionoptix™ (Milton, USA) kombiniert war. Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau der Messapparatur. Die Zellen werden kontinuierlich mit Licht beschienen, welches durch eine 550nm Langpass-Filter geleitet wurde, um den Fluoreszenzfarbstoff vor dem Ausbleichen zu schützen. das Emmissionsmaximum von Fura-2 liegt bei ca 500nm. Die Messung der Calciumkonzentration durch Fura-2 wird somit von dem einstrahlenden Licht nicht beeinflusst. Das emittierte Licht wird durch einen dichroitischen Spiegel aufgetrennt. Licht mit einer Wellenlänge, die größer ist als 550nm wurde zur Kamera (MyoCam IonOptix™) geleitet. Das von Fura-2 emittierte Licht wurde in Richtung eines Photomultipliers (PMT) reflektiert. Als Lichtquelle wurde eine Xenonbogenlampe mit einer Leistung von 75W benutzt. Die Anregungswellenlängen von 340nm und 380nm werden durch einen rotierenden Spiegel, der das Licht über zwei verschiedene Filter in das Mikroskop leitet, erzeugt (HyperSwitch light source system, IonOptix™).

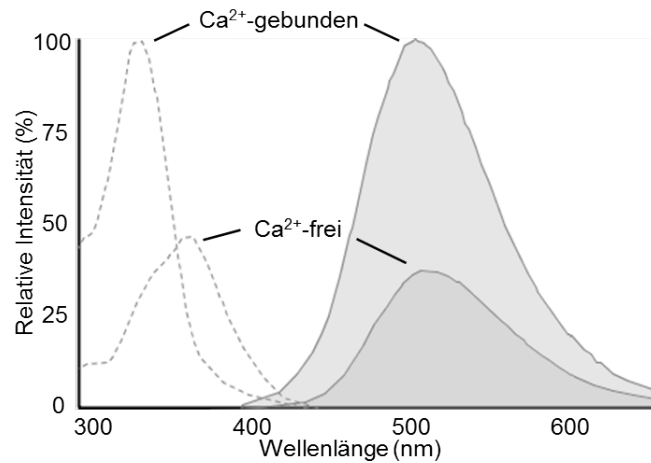
Für die Messung wurden die vorbereiteten Zellen in eine Kammer gegeben, über die 27°C warmer Messpuffer perfundierte. Die Kammer war auf einem inversen Mikroskop befestigt (Motic AE31). Für die Messungen wurden einzelne vitale Zellen ausgewählt. Zellen mit abgerundeten Zellgrenzen oder spontanen Kontraktionen wurden von den Messungen ausgeschlossen. Die Stimulation erfolgt mit einer Frequenz von 0,5Hz und 20V für 3ms (*MyoPacer*, IonOptix™). Zur Datenerfassung wurde die Software von Ionoptix benutzt (Ionwizard™). Die Messung des Calciumgehalts der Zelle erfolgte durch Messung der Fluoreszenz. Fura-2-AM ist ein „*dual-excitation-single-emission*“-Fluoreszenzfarbstoff und ein Calciumchelator. Das bedeutet, dass sich sein Anregungs-



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der IonOptix™ Messapparatur. Gleichzeitiges Messen der Kantenlänge und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wird ermöglicht. Aus Ren und Wold, 2001; © Springer, 2001

spektrum durch Bindung von Calcium verschiebt (s. Abbildung 2.2) während das Emissionsspektrum davon unbeeinflusst bleibt. Dies wird sich zu Nutze gemacht, in dem die Anregungswellenlänge in hoher Frequenz von 340nm (saturiert) zu 380nm (ohne Calcium) wechselt, während durchgehend die Emission zwischen 480nm und 520nm gemessen wird. Die Emissionen während der verschiedenen Anregungswellenlängen werden ins Verhältnis gesetzt, wobei sich der Zähler (Numerator) aus der Emission bei 340nm und der Nenner (Denominator) aus der Emission bei 380nm gebildet wird. So wird bei steigender Calciumkonzentration in der Zelle das Verhältnis  $F_{340/380}$  größer und bei sinkender kleiner.

Die Daten einer Zelle wurden für mindestens 45s aufgezeichnet. Die NCX Funktion und die SR-Calciumbeladung wurde mit Hilfe des RyR2 selektiven Kanalöffners Koffein untersucht. Die Stimulation erfolgte lokal und zellnah über eine mit einer 10mM Koffeinlösung gefüllte 21-Gauge Kanüle. Direkt nach der Kontraktion der Zelle wur-



**Abbildung 2.2:** Anregungs- (gestrichelt) und Emissionsspektrum (gefüllt). Mit der Calciumkonzentration verschiebt sich das Anregungsmaximum von ca. 340nm Ca<sup>2+</sup>-frei zu ca. 380nm Ca<sup>2+</sup>-gebunden. Erstellt mit dem SpectraViewer.

de der Zufluss gestoppt und weiter mit dem Messpuffer perfundiert um weitere Zellen messen zu können. Nach jeder Messung wurde die Basislinie des Calciumsignals an drei Stellen ohne Zellen für jeweils 5s gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Ionwizard-Software. Diese bildet aus den gemessenen Peaks einen Mittelwertpeak und berechnet aus diesem mehrere Parameter (s.u.). Unregelmäßige Peaks wurden von dem Mittelwert ausgeschlossen. Der Bereich des auszuwertenden Peaks wurde auf eine Dauer von 1,2s festgelegt. Der Startzeitpunkt lag dabei 0,2s vor Beginn des Stimulus.

Für die Auswertung der Calciumsignale wurden zunächst die Basislinie mit den Werten für Numerator und Denominator korrigiert. Für die Auswertung der Calciumtransienten wurden folgende Parameter benutzt:

- Bei den neonatalen Kardiomyozyten wurde die Zeit zur Basislinie 90% ausgewertet. Diese entspricht der Zeit, die nach dem Maximum bis zur 90%igen Rückkehr auf Basalniveau verstreicht. Sie ist ein Maß für die Dauer der Diastole und die Geschwindigkeit des Rücktransport in das SR. Es wurden die Werte bei 90% benutzt, um Ungenauigkeiten durch Rauschen der Basislinie zu umgehen.
- Die Höhe des Maximums entspricht dem maximalen Calciumgehalts im Zytosol während der Systole.
- Die Höhe des Maximums nach Koffeininduktion entspricht dem Calciumgehalt im SR.
- Der  $\tau$ -Wert des Koffein-induzierten Transienten, der über die Abfallskinetik die



NCX-Funktion beschreibt.

### 2.2.9 Analyse der cAMP-Akkumulation mittels eines Radio-Immun-Assays (RIA)

Für die Analyse der cAMP-Akkumulation wurden die NRKM zunächst wie bereits beschrieben mit RKIP oder LacZ transduziert. Nach 2-stündiger Inkubation in Medium ohne FCS wurde das Medium der Zellen durch einen cAMP-Puffer ersetzt. Um die cAMP-Akkumulation, die durch die Isoprenalinstimulation induziert wurde, messen zu können wurden dem Puffer IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, 100 $\mu$ M) als Phosphodiesterase-Inhibitor zugesetzt. Die NRKM wurden für 20min bei 37°C unstimuliert und mit steigenden Isoprenalinkonzentrationen (10nM, 100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 1mM, 10mM) stimuliert. Durch Zugabe von eiskalter 20% (v/v) Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>, Endkonzentration 2% (v/v)) wurde der Versuch gestoppt und die Zellen bzw. die Proteine denaturiert. Die Lösung wurde mit 1M KOH neutralisiert und 10min bei 25,200xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für den cAMP Radioimmuno-Assay (Beckmann&Coulter) verwendet. Bei diesem Kit sind die Reaktionsgefäße mit cAMP-spezifischem Antikörper beschichtet. Der Ansatz besteht aus radioaktiv-markiertem [<sup>125</sup>I]cAMP und den verdünnten (2:5) Proben. Das in den Proben vorhandene cAMP konkurriert mit dem radioaktiv-markierten cAMP um die Bindung an den Antikörpern und verdrängt dies in Abhängigkeit der Konzentration in der Probe. Mit jedem Versuch wurde auch eine Standardgerade erstellt, durch die die cAMP-Konzentration genau bestimmt werden konnte. Für die Auswertung wurden die Werte auf die Probe ohne cAMP-Zugaben bezogen. Jeder Assay wurde auf die jeweiligen LacZ-Proben bezogen, d.h. dass die maximale Antwort der LacZ-transduzierten Zellen bei 10mM Isoprenalinstimulation als eins gesetzt wurde. Für die Kurvenanpassung wurde der Hill-Slope=1 gesetzt.

### 2.2.10 Analyse der Markergenexpression durch rtPCR

Zur mRNA-Expressionsanalyse bestimmter Markergene wird eine quantitative PCR (real time-PCR oder reverse Transkriptase PCR) genutzt. mRNAs werden bei der Transkription gebildet und sind ein Zwischenprodukt zwischen dem konstanten Genom und dem wechselnden Proteom einer Zelle und stellen daher einen quantifizierbaren Einblick in die Transkriptionsaktivität bestimmter Gene dar.

### **RNA-Präparation**

Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kit (Qiagen). Vor Beginn wurden alle Arbeitsmaterialien gründlich mit RNase-Zap<sup>®</sup> gereinigt. Die Lyse des Gewebes erfolgte in einem stark denaturierenden Puffer zur Inaktivierung der im Gewebe vorhandenen RNAsen. Mit Proteinase K erfolgte ein zusätzlicher Verdau. Dieser ist in Herzgewebe nötig, da es durch den kontraktilen Apparat ein sehr strukturproteinreiches Gewebe ist. Durch Zugabe von Ethanol zum salzhaltigen Puffer wurden die Nukleinsäuren (RNA, DNA) gefällt. Dieses Lysat wurde auf RNA-bindende Säulen mit einer Silica-Gel-Membran gegeben. Diese Membran ist so konzipiert, dass sie nur RNA bindet, die länger als 200 Nukleotide ist, sodass kleine RNA-Spezies wie z. B. transfer-RNA ausgeschlossen werden. Durch die Ethanol-haltigen Waschschrirte verbleibt die RNA auf der Säule. Um ein Stören der genomischen DNA bei der rtPCR zu verhindern, wird diese durch RNase-freie DNase auf der Säule verdaut und ausgewaschen. Die Elution der reinen RNA erfolgt mit RNase-freiem Wasser. Bis zur Umschreibung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

### **Reverse Transkription**

Die mRNA stellt nur einen geringen Teil, der isolierten RNA dar. Weiterhin vorhanden ist z.B. ribosomale RNA. Um mRNA-spezifische Untersuchungen machen zu können, wird sich eine besondere Eigenschaft der mRNA zunutze gemacht. Während der Transkription, erhält die gespleißte pre-RNA neben einem 5' Cap, das den Transport aus dem Zellkern und Schutz vor Abbau vermittelt, einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende, der in der Einleitungsphase der Translation von Bedeutung ist. Die für die Umschreibung benötigte, aus Retroviren stammende, reverse Transkriptase kann aus einsträngiger RNA DNA (cDNA) synthetisieren. Wie alle Polymerasen arbeitet auch die reverse Transkriptase in 3'-Richtung und benötigt einen Startpunkt (Primer) zur Synthese. Durch Einsatz eines oligo dT-Primers, der an den Poly-A-Schwanz der mRNAs bindet, werden ausschließlich die mRNAs in cDNAs umgewandelt. Dies geschieht in einem 1:1 Verhältnis, welches eine Quantifizierung letztlich möglich macht. Für eine rtPCR ist es nötig, falsch positive, d.h. durch genomische DNA verursachte Ergebnisse ausschließen zu können. Einerseits werden die PCR-Primer dafür so gewählt, dass sie ein Intron überspannen, welches im Gegensatz zur gespleißten mRNA in genomischer DNA noch vorhanden ist, und so durch dessen Länge eine Amplifikation verhindert wird. Andererseits wird während der reversen Transkription eine Probe ohne reverse Transkriptase belassen und

dient so als Negativkontrolle. Zur Erstellung einer Standardreihe wurden vier beliebige Proben verwendet. Zunächst wurde die Konzentration der RNA am Nanodrop (Peqlab) gemessen. Für die Umschreibung in cDNA wurde 1µg RNA eingesetzt. Diese erfolgte mit dem Superscript™-Kit (Invitrogen). Die RNA wurde mit den Oligo-dTs (Endkonzentration: 1µM) und den dNTPs (Endkonzentration: 0,5mM) für 10min auf 70°C erhitzt. In diesem Schritt wurde möglicherweise vorhandene doppelsträngige RNA denaturiert und das Binden der Oligo-dTs ermöglicht. Anschließend wurde 5xPuffer, DTT (Endkonzentration: 10mM), RNAsin (RNase-Inhibitor von OMEGA) und die reverse Transkriptase (außer bei der Negativkontrolle) zugegeben. Die Umschreibung erfolgte für 60min bei 42°C. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 70°C für 15min. Dann wurde die gewonnene cDNA 1:12,5 mit DEPC-Wasser verdünnt.

### Quantitative PCR

Bei der rtPCR wird durch die Primer (Tab. 3) das Fragment vorgegeben, das amplifiziert wird. Eine der Besonderheiten dabei ist jedoch, dass nach jedem Zyklus die Fluoreszenz der Probe gemessen wird. Ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert (EvaGreen), ist dem Reaktionsmix zugesetzt. Das bedeutet, dass mit jedem Zyklus aufgrund der DNA-Vervielfältigung auch die Bindung des interkalierenden Farbstoffes und daher die Fluoreszenz zunimmt (d.h. sich im Idealfall verdoppelt). Die Zyklusanzahl, die zum Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes benötigt wird, wird gemessen (*threshold cycle*,  $C_T$ ). Das heißt, dass bei mRNAs/cDNAs, die in geringer Anzahl vorliegen, dies länger dauert als bei solchen, die stark exprimiert werden. Um diese Werte unabhängig von Pipettierfehlern und der eingesetzten RNA- und cDNA-Konzentration betrachten zu können, wird gleichzeitig die Expression eines "*housekeeping*Gen analysiert, das als Referenzwert genutzt wird. Ein "*housekeeping*Gen ist ein Gen, das in einer Zelle konstant und stark exprimiert wird. Für diese Versuche wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als "*housekeeping*Gen verwendet. Diese ist ein wichtiges Enzym der Glykolyse. Für die rtPCR wurde der 2xSupermix SsoFast™EvaGreen (Biorad) benutzt. In einer 384-Well Platte wurden jeweils 2,5µl cDNA (entspricht 10ng der Ursprungs-RNA), der vier Standards, der Negativkontrolle und eines Leerwerts (DEPC-Wasser) vorgelegt und anschließend die Primer (480nM) mit dem Supermix dazu gegeben. Der Supermix enthält dNTPs, eine DNA-Polymerase und das Fluorophor in einer gepufferten Lösung. Es wurde der C1000 Thermocycler (Biorad) mit folgendem PCR-Programm benutzt:

98°C	2min		
98°C	0,2min		40 Zyklen
56°C	0,2min	Fluoreszenzmessung	
65°C	0,4min	Fluoreszenzmessung	Schmelzkurve
65°C-95°C	0,5°C pro 0,05min	Fluoreszenzmessung	

Mittels der Schmelzkurve zum Ende der PCR konnte überprüft werden, ob die Fluoreszenzkurve das Resultat nur eines oder mehrerer PCR-Produkte ist. Dazu wurde die Temperatur schrittweise erhöht und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Ein Abfall der Fluoreszenz zeigt den Zeitpunkt an, zu dem der Doppelstrang denaturiert. Die Schmelztemperatur ist längen- und sequenzabhängig und deshalb produktspezifisch. Die Auswertung der rtPCR erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak. Mit dieser kann die Expression in Relation zu einem Referenzgen und als Vielfaches eines basalen Zustands dargestellt werden. Normalisiert wird die Expression in diesen Versuchen durch GAPDH. Als Referenzwert wurden in dieser Arbeit die unbehandelten Wildtypproben definiert. Dazu werden zunächst die  $\Delta C_T$  gebildet bzw. das Testgen in Verhältnis zum Referenzgen dargestellt.

$$\Delta C_T = C_T (\text{Testgen}) - C_T (\text{GAPDH})$$

Anschließend wird  $\Delta C_T$  der anderen Proben im Verhältnis zum Basalzustand betrachtet. Bei mehr als einem basalen Wert wird der Mittelwert aller basalen  $\Delta C_T$  verwendet.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Proben}) - \Delta C_T (\text{Basal})$$

Im letzten Schritt wird die Effizienz der PCR einberechnet. Dabei wird angenommen, dass sich die Kopienzahl des amplifizierten Gens innerhalb eines Zyklus verdoppelt. Das normalisierte Verhältnis zwischen den Proben und dem Basalzustand wird deshalb wie folgt berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### 2.2.11 Bestimmung der $\beta$ AR-Expression in isolierten Herzmembranen

Um zu untersuchen wie sich die RKIP-Expression auf die  $\beta$ AR-Dichte auswirkt wurden Kardiomyozytenmembranen isoliert. Dazu wurde linkventrikuläres Gewebe von Wt und RKIP-tg, das basal sowie nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion entnommen wurde, benutzt. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe in Homogenisierungspuffer mit einem Ultrathurrax zerkleinert. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugation

bei 1,700xg, 4°C für 10min entfernt. Die Überstände wurden erneut bei 50,000xg 4°C für 30min zentrifugiert um die Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Der Überstand, der das Zytosol enthält wurde verworfen und das Pellet in Membranpuffer resuspendiert. Die Rezeptordichte wurde mittels der maximalen Bindung von [<sup>125</sup>I]Cyanopindolol an die βRezeptoren analysiert. Dazu wurden 50µg Membranprotein mit 300pM des Antagonisten [<sup>125</sup>I]Cyanopindolol in An- oder Abwesenheit von 100µM Alprenolol, durch den die unspezifische Bindung ermittelt werden sollte für 90min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden über mit Polyethylenimine (0,3%, v/v) befeuchtete Glassfaserfilter (Millipore) gegeben und mit eiskaltem 50mM Tris-HCl (pH7,6) gewaschen. Anschließend wurde der verbliebene Radioligand im γ-Counter für 1min gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (+ Alprenolol) von der Gesamtbindung (-Alprenolol). Aus der Konzentration des Radioliganden wurde, ein 1:1 Verhältnis angenommen die Konzentration der βAR berechnet. Diese wurde anschließend auf die eingesetzte Proteinkonzentration bezogen und in fmol/µg angegeben.



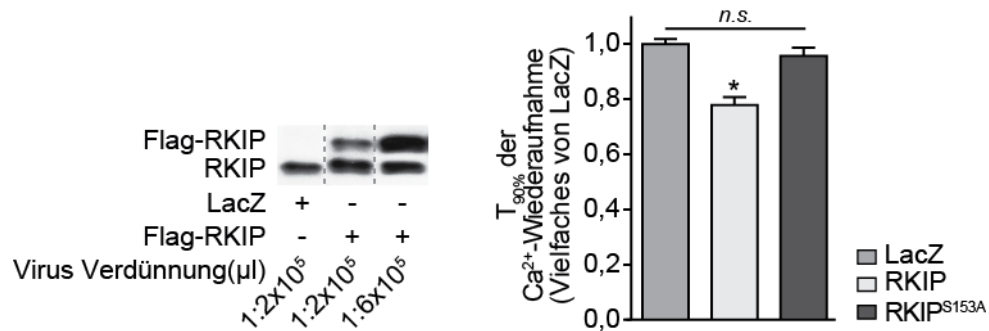
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Effekte der RKIP-Expression in neonatalen Kardiomyozyten

Zur Untersuchung einer gesteigerten RKIP-Expression wurden zunächst neonatale Ratten-Kardiomyozyten (NRKM) als Modellzellsystem benutzt. Eine Überexpression wurde hier durch Transduktion der Zellen mit adenoviralen Vektoren, die für RKIP, seine phosphorylierungsdefiziente Mutante RKIP<sup>S153A</sup> oder Kontrollproteine wie das grün fluoreszierende Protein (eGFP) oder die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) kodieren. Die Kontrollvektoren greifen auf die gleiche Weise in die Transkription ein. Die daraus entstehenden Proteine haben jedoch keine physiologische Funktion in Kardiomyozyten, da sie art- und zweckfremde Proteine darstellen.

#### Die Expressionslevel von RKIP hat Einfluss auf die Kontraktilität

Durch die GRK2-inhibitorische Funktion von RKIP besteht die Möglichkeit Einfluss auf die  $\beta$ AR zu nehmen und da sie die bedeutendsten Rezeptoren für die Regelung der Kontraktilität sind, auch auf die kontraktile Funktion. Frühere Ergebnisse von Lorenz et al., 2003 zeigen außerdem, dass eine Reduktion der RKIP-Expression zur Senkung der kontraktiven Aktivität führt. Mittels Transduktion der Zellen sollten deshalb die Effekte von RKIP auf die Kontraktilität untersucht werden. Die Auswertung von Calciumtransienten ist ein Parameter der zu diesem Zweck herangezogen werden kann. Die Calciumtransienten werden mittels des, in das Zytoplasma eingebrachten, calciumsensitiven Farbstoffs Fura-2 aufgezeichnet. Der Transientenaufstieg gibt Aufschluss über die Calciumströme aus dem sarcoplasmatischen Retikulum (SR) und dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma. Umgekehrt beschreibt das Abfallen des Transienten den Rücktransport des Calciums in das SR und den Extrazellulärraum. Die Beschleunigung des Calciumeinstroms, sowie des Ausstroms impliziert eine Erhöhung der Kontraktilität. Die in diesem Versuch verwendeten NRKM bilden eine Zellverband, der spontane Kontraktionen zeigt. Die Zellen wurden transduziert, mit Fura-2 beladen und anschließend gemessen.



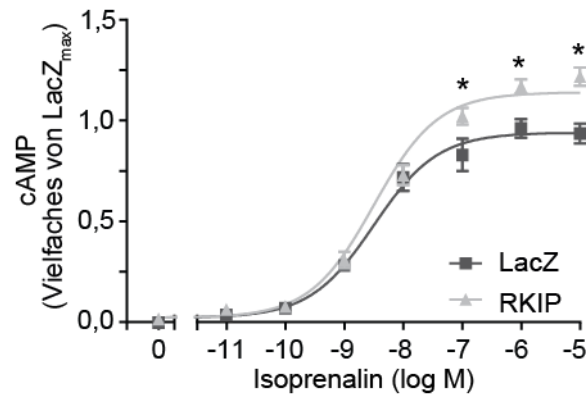
**Abbildung 3.1:** Expressionskontrolle und Calciummessungen in neonatalen Kardiomyozyten. Repräsentative *Western Blot* Analyse mit einem Antikörper gegen RKIP (Lorenz et al., 2003) von mit LacZ und RKIP (zwei verschiedenen Viruskonzentrationen) transduzierten Kardiomyozyten (links). Zeit bis zu 90%iger Rückkehr ( $T_{90\%}$ ) zur Basallinie des Calciumtransienten von LacZ, RKIP und RKIP<sup>S153A</sup> transduzierten Kardiomyozyten dargestellt als Vielfaches der LacZ-transduzierten Kontrolle (rechts, Mittelwert aus LacZ, RKIP,  $n=15$ , RKIP<sup>S153A</sup>,  $n=14$ ). Die LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Transduktionen;  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.1 sieht man die Erhöhung der RKIP Expression in den NRKM. Eine geringere Virusmenge ( $1:2 \times 10^5$ ) führte dabei zu einer ca. 75% Erhöhung und eine höhere Virusmenge ( $1:6 \times 10^5$ ) zu einer 200% Erhöhung des endogenen RKIP-Levels. Für Flag-markiertes Wildtyp und flag-markiertes phosphorylierungsdefizientes RKIP war die Expression vergleichbar. Die Auswertung der Calciumtransienten zeigte für RKIP transduzierte Zellen eine relative Beschleunigung der Calciumtransienten im Hinblick auf die Relaxation, also die Calciumrückführung aus dem Zytosol in das SR und den Extrazellulärraum. Im Vergleich zu den Kontroll-transduzierten Zellen sowie zur phosphorylierungsdefizienten Mutante war die Zeit, die für den Abfall des Calciumtransienten (d.h. vom Maximum des Transienten bis zur Wiederkehr auf das Niveau, das vor Beginn des Anstiegs bestand) verging, bei den RKIP exprimierenden Zellen kürzer.

### Die RKIP-Expression erhöht den maximalen cAMP-Spiegel

Die Kontraktilität von Kardiomyozyten ist in großen Teilen von den  $\beta$ AR beeinflusst (Rockman et al., 2002). Die erhöhte Kontraktilität kann somit ein Indiz für eine gesteigerte Aktivierung der  $\beta$ AR sein. Um zu untersuchen, ob  $\beta$ AR abhängige Signalwege in RKIP transduzierten Zellen verstärkt sind, wurde die Isoprenalin ( $\beta$ AR-Agonist)-induzierte cAMP-Akkumulation untersucht, da die Stimulation der  $\beta$ AR eine Steigerung der cAMP-Spiegel, die Aktivierung der PKA und damit eine Verbesserung der elektromechanischen Kopplung mit sich zieht.



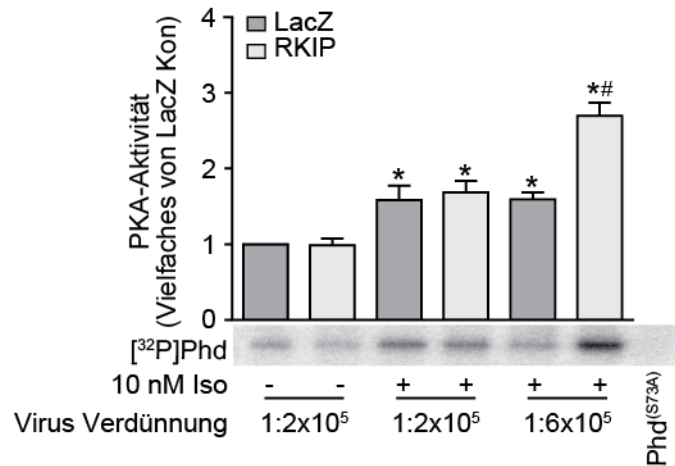


**Abbildung 3.2:** Dosis-Wirkungskurve der cAMP Akkumulation in transduzierten NRKM (LacZ und RKIP). Aufgetragen ist die cAMP-Konzentration als ein Vielfaches der maximalen cAMP-Konzentration der LacZ-transduzierten Zellen gegen den dekadischen Logarithmus der Isoprenalin-Konzentration (Mittelwert aus  $n=4$ ). Das Maximum der LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber RKIP mit der jeweiligen Isoprenalin-Konzentration;  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.2 wurde die Dosis-Wirkungskurve der Isoprenalin-induzierten cAMP-Akkumulation aufgetragen. Die cAMP-Konzentration wurde durch einen Radio-Immuno-Versuch bestimmt. Hier sieht man, dass RKIP unter unstimulierten Bedingungen keinen Effekt auf die cAMP-Produktion hatte (LacZ =  $2,4 \pm 0,88$  nM vs. RKIP =  $2,0 \pm 0,88$  nM). Betrachtet man jedoch die Produktion nach Stimulation mit 100 nM, 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M (LacZ =  $26 \pm 6,9$  nM vs. RKIP =  $32 \pm 8,3$  nM), stellt man fest, dass in diesen Konzentrationsbereichen die Antwort der RKIP-transduzierten Zellen erhöht war. Eine Erhöhung der RKIP-Level um ca. 75% (Virusverdünnung 1:2x10<sup>5</sup>, siehe Abb. 3.1) ist somit in der Lage  $\beta$ AR-abhängige Signalwege zu erhöhen. Besonders zu beachten ist die Tatsache, dass RKIP keine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve verursachte und die EC50 der RKIP-Zellen gleich dem der LacZ-Kontrolle waren. Eine mögliche Ursache könnte ein zu geringes RKIP-Expressionslevel gewesen sein. Diese Möglichkeit wurde in folgendem Versuch auf Ebene der PKA-Aktivität in Abhängigkeit der RKIP-Expression untersucht.

### Das RKIP-Expressionsniveau hat Einfluss auf die PKA-Aktivität in NRKM

Eines der Schlüsselenzyme bei der Beschleunigung der elektromechanischen-Kopplung in Herzzellen ist die durch cAMP aktivierte PKA. Von ihr ist die Phosphorylierung einiger Schlüsselproteine abhängig, die die Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeit erhöhen.

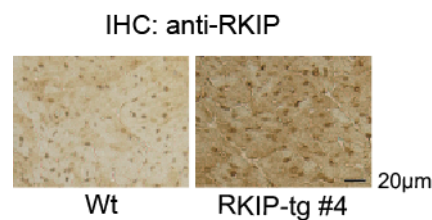


**Abbildung 3.3:** Untersuchung der PKA-Aktivität in Zelllysaten von transduzierten NRKM (LacZ und RKIP). Repräsentative autoradiografische Aufnahme und Quantifizierung der *in vitro*  $^{32}\text{P}$ -Phosphorylierung von dem PKA-Substrat Phosducin. Aufgetragen wurden Versuche in NRKM (Mittelwert aus  $n=4$ ), transduziert mit verschiedenen Virusverdünnungen von LacZ oder RKIP, in An- oder Abwesenheit einer Stimulation mit Isoprenalin. Als Kontrolle der PKA-Spezifität dieser Phosphorylierungsstelle wurde eine phosphorylierungsdefiziente Mutante von Phosducin ( $\text{Phd}^{\text{S73A}}$ ) aufgetragen. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz erzeugt. Die unstimulierte LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den unstimulierten Bedingungen; # signifikant gegenüber allen anderen Bedingungen;  $p < 0,05$ .

Die PKA-Aktivität wurde mittels eines spezifischen Substrats und radioaktiv markiertem  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP quantifiziert. Als Substrat für die PKA wurde Phosducin benutzt, das eine PKA-Phosphorylierungsstelle am Serin 73 besitzt (Bauer et al., 1992). Für den Versuch wurde die zytosolische Fraktion der transduzierten NRKM, die die aktiven katalytischen Einheiten der PKA beinhaltet, mit Phosducin und  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP in einem Phosphorylierungspuffer kombiniert. Die Übertragung der markierten Phosphate konnte im Autoradiogramm quantifiziert werden. Als Kontrolle wurde die phosphorylierungsdefiziente Mutante des Phosducin verwendet. Durch das Fehlen des Signals kann die Bande identifiziert und als spezifisch für diese Phosphorylierungsstelle angenommen werden. In Abbildung 3.3 wurde die PKA-Aktivität unter Einfluss einer Isoprenalinstimulation und der RKIP-Expressionmenge aufgetragen. Die Isoprenalinkonzentration wurde im Bereich des EC<sub>50</sub>s (10 nM) gewählt, da es bei der cAMP-Akkumulation in diesem Bereich keinen Unterschied gab. Es zeigt sich, dass RKIP, ähnlich wie auf die cAMP Produktion, auch auf die Aktivität der PKA im unstimulierten Zustand verglichen mit den LacZ-Zellen keinen Einfluss hat. Auch bei einer Isoprenalinkonzentration, die im Bereich des EC<sub>50</sub>s liegt, sieht man analog zu Abbildung 3.2 keinen Unterschied. Erst bei Erhöhung des Expressionsniveaus hat RKIP eine steigernde Wirkung auf die PKA-Aktivität.

### 3.2 Effekte der RKIP-Expression in transgenen Mäusen

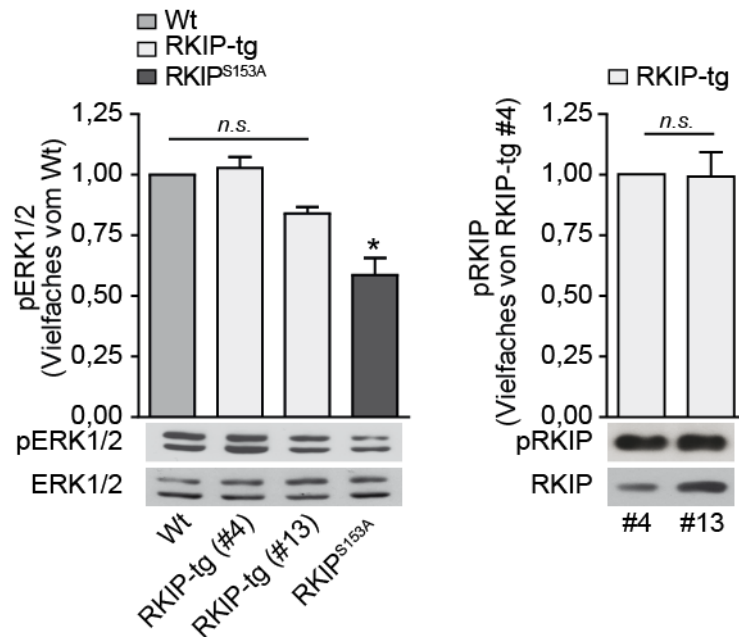
Die Untersuchungen an NRKM weisen daraufhin, dass RKIP eine bestärkende Wirkung auf die Kontraktilität und die die Kontraktilität-vermittelnden Signalwege von Herzzellen hat. Um die Effekte im physiologischen Kontext zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, die RKIP herzspezifisch unter Kontrolle des  $\alpha$ -myosin heavy chain-Promotors exprimieren. Da die Expression des  $\alpha$ MHC-Gens für Kardiomyozyten spezifisch ist kann durch die Nutzung des Promotors eine herzspezifische Expression erreicht werden. Daraus ergaben sich zwei Linien, die RKIP in unterschiedlicher Höhe exprimieren. Die Linie # 4 zeigt eine geringere Expression als die Linie #13. Sowie zwei Linien (#10 und #13) für die phosphorylierungsdefiziente Mutante, RKIP<sup>S153A</sup>, die eine vergleichbare Expression aufweisen.



**Abbildung 3.4:** Untersuchung der RKIP-Expression in transversalen ventrikulären Schnitten von Wildtyp FVB/N (Wt) und RKIP-transgenen Linie # 4(RKIP-tg # 4) Mäusen. Repräsentative immunhistochemische (IHC) Färbungen mit einem Antikörper gegen RKIP (Lorenz et al., 2003).

Die Überexpression wurde zum einen mittels Immundetektion im *Western Blot* kontrolliert (siehe Schmid et al., 2015). Hier wurden alle verwendeten Linien untersucht und das Maß der erhöhten Expression quantifiziert. Dabei ergab sich, dass die RKIP-tg der Linie #4 eine dreifache und die RKIP-tg der Linie #13 eine ca. siebenfache Erhöhung zeigen. Die beiden RKIP<sup>S153A</sup>-Linien sind im Bereich der RKIP-tg Linie #4 (ca. dreifach). Zum anderen wurden immunhistochemische Untersuchungen an Herzschnitten angefertigt um die Überexpression zu visualisieren (Abbildung 3.4). Man sieht, dass die Braunfärbung, die einem vermehrten Auftreten von RKIP entspricht, in den Schnitten der RKIP-transgenen Tiere der Linie #4 verstärkt ist. Dies unterstützt die Ergebnisse der Quantifizierung und bestätigt die Überexpression von RKIP in den RKIP-tg.

Die bekannteste Wirkung des RKIP ist die Inhibition von Raf. Durch die Phosphorylierung an Serin 153 wird die Dimerisierung und Inhibition der GRK ausgelöst. Der Austausch des Serin durch Alanin in der phosphorylierungsdefizienten Mutante verhindert also die Dimerisierung und dadurch die GRK-inhibitorische Funktion von RKIP.



**Abbildung 3.5:** Untersuchung der ERK1/2- und der RKIP-Phosphorylierung unter Abhängigkeit des Expressionsniveaus von RKIP. *Western Blot* Analyse und ein repräsentativer *Western Blot* der ERK1/2-Phosphorylierung (Antikörper: pERK1/2 (T202/Y204); ERK1/2) in Wt, RKIP (RKIP-tg) mit ca. dreifach (#4) und siebenfach (#13) erhöhter Expression und RKIP<sup>S153A</sup> Mäusen (links). Der Wt ist dabei auf 1 gesetzt. *Western Blot* Analyse und ein repräsentativer *Western Blot* der RKIP-Phosphorylierung (Antikörper: pRKIP (pSer153), RKIP (Lorenz et al., 2003)) in RKIP (RKIP-tg) mit ca. dreifach (#4) und siebenfach (#13) erhöhter Expression (rechts). RKIP-tg #4 ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Genotypen;  $p < 0,05$ .

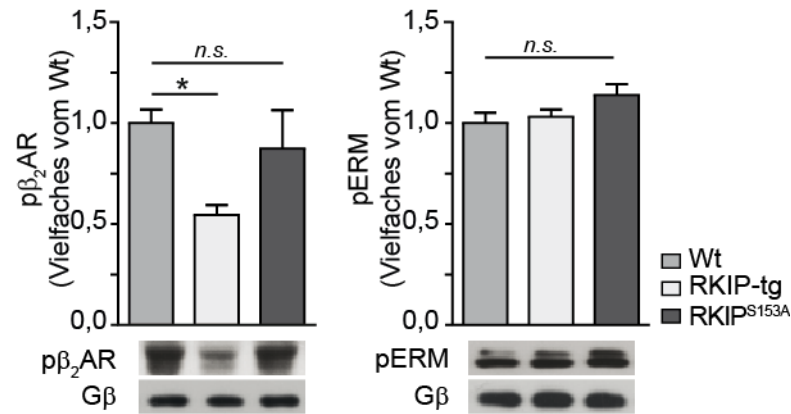
In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse wie sich RKIP<sup>S153A</sup> nun gegenüber Raf verhält. Versuche die Raf-Inhibition in NRKM zu untersuchen zeigten keine Unterschiede zwischen den verschieden-transduzierten Zellen (LacZ, RKIP, RKIP<sup>S153A</sup>).

In den Ergebnissen von Deiss et al., 2012 zeigte sich bereits, dass das Gleichgewicht zwischen der phosphorylierten und unphosphorylierten Form (an Ser 153) stark auf die Seite der phosphorylierten Form verschoben ist. Dies legt nahe, dass es sich um sehr kleine Unterschiede handelt. Eine weitere Erklärung könnte die nur kurzfristige Überexpression von RKIP und RKIP<sup>S153A</sup> durch Transduktion der NRKM sein. Aus diesem Grund wurden die transgenen Mäuse auf ihre inhibitorischen Effekte gegenüber Raf im Herzen untersucht. Da Raf am Anfang der Raf/MEK/ERK-Kaskade steht, wurde die Phosphorylierung und damit die Aktivität der Effektor kinase ERK als Maß für die Inhibition verwendet. Abbildung 3.5 (links) zeigt repräsentative *Western Blots* der ERK-Phosphorylierung am TEY-Motiv (maßgeblich für die Aktivität) und die Quantifizierung

dieser. Eine moderate dreifache Erhöhung der Expression von RKIP (Linie #4) beeinflusst die ERK-Aktivität nicht. Die weitere Erhöhung der Expression auf das Siebenfache (Linie #13) zeigte eine leichte aber nicht signifikant niedrigere ERK-Aktivität und erst die Expression der phosphorylierungsdefizienten Mutante (RKIP<sup>S153A</sup>) bewirkte eine Inhibition um ca. 40% des Wt. Dies zeigt eine Raf/MEK/ERK-Inhibition von RKIP, die stark von der Expressionsmenge abhängt. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des RKIP sich abhängig von den beiden Expressionslevel der RKIP-tg Mäuse ändert, wurde die Phosphorylierung an Serin 153 des RKIP in Herzlysaten untersucht. Hier zeigte sich, dass die Erhöhung der Expression vom Dreifachen auf das Siebenfache nicht zu einer weiteren Erhöhung der RKIP-Phosphorylierung führt. Dies deutet darauf hin, dass die basale PKC-Aktivität trotz der Vermehrung des Substrats RKIP keine weitere Phosphorylierung vermitteln kann.

Die Tatsache, dass RKIP bei moderater Expression keine Raf-inhibitorischen Effekte hat, steht im Einklang mit den Erkenntnissen, dass RKIP im Herzen zu einem großen Teil an GRK2 gebunden ist (Deiss et al., 2012). Deshalb sollte im nächsten Schritt die GRK2-Aktivität auf verschiedene GRK2-spezifische Substrate untersucht werden. Für die Wahl der Substrate war das Vorhandensein von Antikörpern, die für die GRK2-Phosphorylierungsstellen spezifisch sind und die Anwendbarkeit dieser in kardialen Lysaten wichtig, da die Analyse über *Western Blots* erfolgen sollte. Zur Untersuchung der Aktivität gegenüber eines Rezeptors wurde die GRK-Phosphorylierungsstelle an Serin 356/366 des  $\beta_2$ AR (Seibold et al., 2000) gewählt. Als zytosolisches bzw. nicht-Rezeptorsubstrat wurde Ezrin gewählt (GRK-Phosphorylierung an Threonin 567; Cant und Pitcher, 2005), das aus der Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-Proteinfamilie stammt, die Aktin-bindende Proteine darstellen und damit eine wichtige Funktion in der Erhaltung des Zytoskeletts besitzen.

In Abbildung 3.6 (links) zeigt sich, dass die Überexpression von RKIP zu einer Reduktion der  $\beta_2$ AR-Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtypen und zur RKIP<sup>S153A</sup> führt. Dies weist darauf hin, dass die GRK in RKIP-transgenen Mäusen gehemmt wird. Die phosphorylierungsdefiziente (RKIP<sup>S153A</sup>) und damit gegenüber der GRK inaktive Mutante zeigt keine Reduktion, was die zuvor beschriebene phosphorylierungsabhängige Hemmung der GRK durch RKIP (Lorenz et al., 2003; Deiss et al., 2012), bestätigt. Im Gegensatz zum  $\beta_2$ AR ist die ERM-Phosphorylierung (Abbildung 3.6, rechts) unter den untersuchten Genotypen nicht unterschiedlich. Daraus kann man schließen, dass RKIP die Funktion der GRK gegenüber den Rezeptoren reguliert und die GRK-Funktion gegenüber dem zytosolischen Substrat Ezrin unter basalen Bedingungen nicht beeinflusst.



**Abbildung 3.6:** Untersuchung der GRK-vermittelten Phosphorylierung eines Rezeptorsubstrats und eines zytosolischen Substrats. *Western Blot* Analyse und ein repräsentativer *Western Blot* der  $\beta_2$ AR (links; Antikörper: p $\beta_2$ AR (S355/S356), G $\beta$ ) und der Ezrin/Radixin/Moesin-Phosphorylierung (rechts; Antikörper: pEzrin (T567)/Radixin (T564) /Moesin (T558), G $\beta$ ) in Wt, RKIP (RKIP-tg)- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen (Mittelwert aus n=7). Der Wt ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Genotypen; *n.s.* nicht signifikant;  $p < 0,05$ .

Um die Effekte von RKIP in Abhängigkeit der  $\beta$ AR zu untersuchen wurden RKIP-transgene FVB/N Mäuse in einen Hintergrund gekreuzt in dem entweder der  $\beta_1$ AR oder der  $\beta_2$ AR fehlt. Als Kontrollmäuse wurden nur die Wurfgeschwister verwendet, da diese den selben gemischten Hintergrund haben. Auch diese Mäuse wurden auf ihre GRK-Aktivität gegenüber Rezeptor- und zytosolischen Substraten (p $\beta_2$ AR, Ezrin) untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1:** Quantifizierung der  $\beta_2$ AR (Antikörper: p $\beta_2$ AR (S355/S356)) und Ezrin/Radixin/Moesin (Antikörper: pEzrin (T567)/Radixin (T564) /Moesin (T558))-Phosphorylierung von Wt und RKIP-tg im  $\beta_1$ KO und  $\beta_2$ KO. Die reinen  $\beta$ KOs sind dabei auf 1 gesetzt. Die Werte stellen den Mittelwert aus n=5 für den  $\beta_1$ KO-Hintergrund und n=6 für den  $\beta_2$ KO-Hintergrund  $\pm$  den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber dem  $\beta_1$ KO;  $p < 0,05$ .

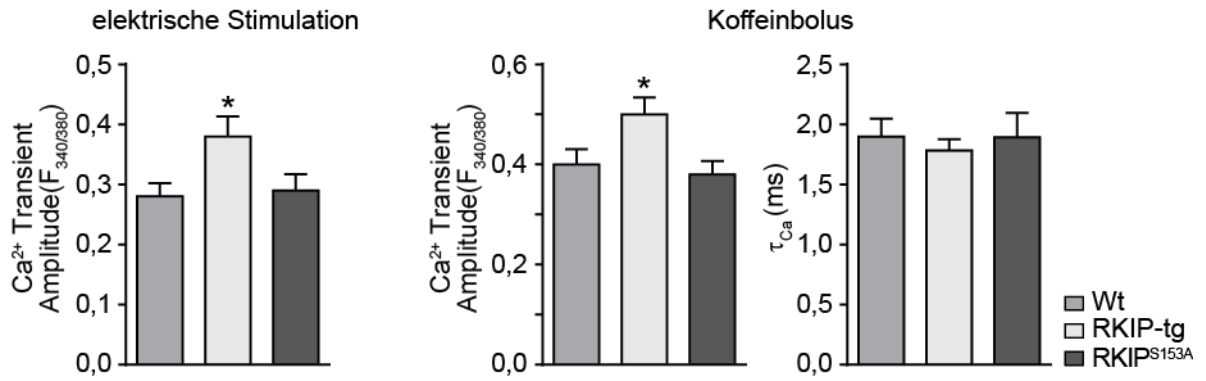
GRK2-Substrat	$\beta_1$ KO	RKIP/ $\beta_1$ KO	$\beta_2$ KO	RKIP/ $\beta_2$ KO
phospho- $\beta_2$ AR	1,0 $\pm$ 0,0	0,72 $\pm$ 0,043*	-	-
phospho-ERM	1,0 $\pm$ 0,0	1,09 $\pm$ 0,067	1,0 $\pm$ 0,0	1,05 $\pm$ 0,10

Es ist zu sehen, dass im Falle des  $\beta_1$ KO und des  $\beta_2$ KO keine Hemmung der GRK-Aktivität auf zytosolischer Ebene zu sehen ist. Im Hinblick auf die Inhibition der Rezeptorphosphorylierung konnte durch das Fehlen des  $\beta_2$ AR in den  $\beta_2$ KO Mäusen nur die  $\beta_1$ KO-Mäuse untersucht werden. Jedoch zeigt sich auch in diesem Hintergrund eine

Spezifität für das Rezeptorsubstrat, da auch in diesen Mäusen die Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR in den RKIP/ $\beta_1$ KO-Mäusen reduziert ist. Mit Hilfe eines *in vitro* Versuchs mit Rhodopsin als Substrat konnte dieser Effekt auch für die RKIP/ $\beta_2$ KO Mäuse gezeigt werden (Schmid et al., 2015).

### Die RKIP-Expression erhöht die SR-Beladung

Wie zuvor in den neonatalen Kardiomyozyten, sollte nun auch die Kontraktilität der adulten Kardiomyozyten aus den transgenen Mäusen untersucht werden. Neben den zuvor erhaltenen Parametern sollte besonderes Augenmerk auf die SR-Beladung gelegt werden. Außerdem ist es in adulten Kardiomyozyten im Gegensatz zu NRKM möglich Einzelzellmessungen anzufertigen, da diese direkt nach der Isolation gemessen werden und keinen Zellverbund ausbilden. Dafür wurde der vorher beschriebene calciumsensitive Farbstoff Fura-2 verwendet. Die adulten Zellen wurden durch retrograde Perfusion der Mausherzen isoliert. Die Kontraktion der isolierten Zellen wurde entweder durch das Anlegen einer Spannung (20V; 0,5Hz) oder einer Bolusgabe von Koffein ausgelöst. Die spannungsabhängige Kontraktion simulierte die Normalbedingung, bei der durch Öffnen der spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle (LTCC) ein Calciumeinstrom ins Zytoplasma induziert wird, welcher die Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren 2 (RyR2) und damit eine weitere Erhöhung des Calciumgehalts aus den sarcoplasmatischen Calciumspeichern zu Folge hat. Der Rücktransport des Calciums geschieht durch die sarcoplasmatische SERCA2 und den membranständigen NCX Transporter. Der Einstrom von Calcium in das Zytoplasma ist ein passiver Vorgang entlang eines Konzentrationsgradienten durch Kanäle und damit sehr schnell während der Rücktransport aus dem Zytoplasma ein aktiver und dadurch langsameren Transportmechanismus darstellt. Das Koffein bewirkt im Gegensatz zur elektrischen Stimulation eine Spannungs- und Calcium-unabhängige andauernde Kanalöffnung des RyR2. Daraus resultiert eine komplette Entleerung des SR, so dass die Amplitudenhöhe eine Aussage über den Gesamtcalciumgehalt im SR zulässt. Außerdem bietet der  $\tau$ -Wert, als eine Konstante, die den Transientenabfall beschreibt, ein Maß für die Aktivität des Natrium-Calciumaustauschers (NCX), der das Calcium aus dem Zytoplasma in den Intrazellulärraum transportiert. Da das SR andauernd entleert wird kann die Aktivität der SERCA2 unter diesen Bedingungen vernachlässigt werden. Vergleicht man nun die Calciumamplituden der verschiedenen Genotypen in Abbildung 3.7 (links), kann man sehen, dass der Calciumgehalt während einer regulären spannungsinduzierten Systole in den RKIP-transgenen Mäusen höher ist. Dies weist auf eine kraftvollere Kontraktion in den Kardiomyozyten RKIP-transgener Mäuse hin. Um zu



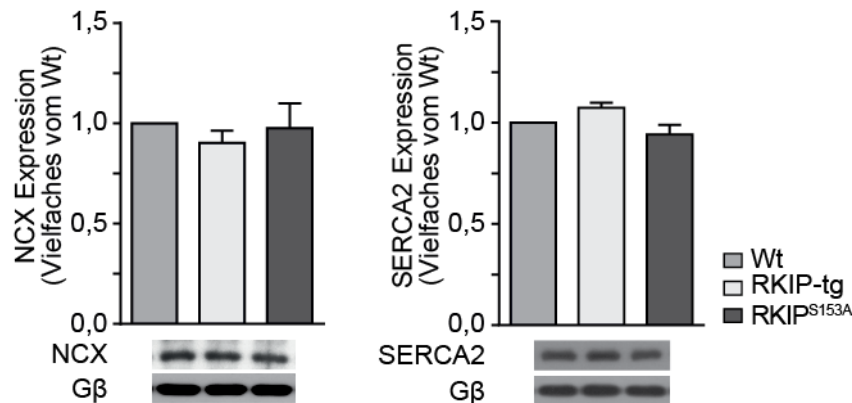
**Abbildung 3.7:** Untersuchungen der Calciumtransienten von adulten Kardiomyozyten. Dargestellt ist der Mittelwert der Amplitude der Calciumtransienten, die elektrisch induziert (20V, 0,5Hz; links) oder durch Koffein induziert (10mM Koffein, lokale Stimulation; Mitte) wurden in F<sub>340/380</sub>. Der  $\tau_{Ca}$ -Wert der Koffein-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten beschreibt dessen Abnahmekinetik in ms ( $\tau_{Ca}$  entspricht der monoexponentiellen Zeitkonstante des Transientenabfall) und ist damit ein indirektes Maß der NCX-Aktivität. Untersucht wurden Wt (n=20), RKIP-tg (n=20) und RKIP<sup>S153A</sup> (n=18). \* signifikant gegenüber allen anderen Genotypen; p < 0,05.

untersuchen wie sich der Calciumgehalt des SR in den verschiedenen Genotypen verhält wurden die Koffein-induzierten Transienten im Hinblick auf ihre Amplitudenhöhe (Abbildung 3.7, Mitte) und Abnahmekinetik (Abbildung 3.7, rechts) ausgewertet. Hier sieht man dass die Kardiomyozyten RKIP-transgener Mäuse auch einen höheren Calciumgehalt im SR zeigen und damit auch mehr Calcium für eine Kontraktion zur Verfügung steht. Betrachtet man in diesem Zusammenhang das  $\tau_{Ca}$  des Transienten, dann zeigt sich, dass sich die Aktivität des Natrium-Calciumaustauschers (NCX) in den Kardiomyozyten RKIP-transgener Mäuse nicht von den anderen Genotypen unterscheidet.

### **RKIP nimmt unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression Calcium-translozierender Proteine**

Wie schon erwähnt sind die Hauptmediatoren der elektromechanischen Kopplung die Kanäle und Transporter, die für den Einstrom und Rücktransport in und aus dem SR verantwortlich sind. Zu Beginn vermitteln die Kanäle LTCC und RyR2 den Calciumeinstrom und verursachen damit die Systole. Nachfolgend vermitteln SERCA2 und NCX, die aktive Transportmechanismen darstellen, den Calciumrücktransport und damit die Diastole. Unterschiede in der Expression und Aktivität dieser Proteine kann eine Änderung der Kontraktilität zur Folge haben. Bei dem bei RKIP beobachteten Phänotyp einer erhöhten Kontraktilität ist es deshalb von Interesse die Proteinexpression der einzelnen Komponenten zu überprüfen. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die oben genannten Proteine sollten Unterschiede im Proteingehalt untersucht werden.

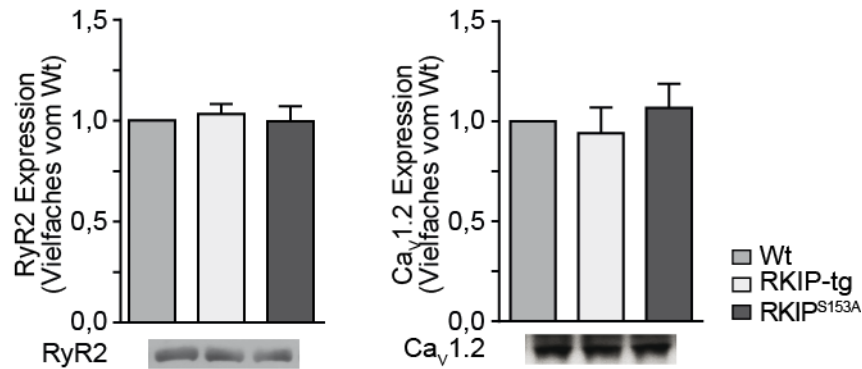




**Abbildung 3.8:** Analyse der Expression des NCX und der SERCA2. Repräsentative *Western Blots* und entsprechende Quantifizierungen des NCX (links) und der SERCA2 (rechts) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=7. Der Wt wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar; p < 0,05.

In Abbildung 3.8 kann man sehen, dass weder die Expression des NCX (links) noch der SERCA2 (rechts) in den Herzen RKIP überexprimierender Mäuse verändert ist. Im Hinblick auf die Aktivität der beiden Proteine kann man in 3.7 sehen, dass auch die Aktivität des NCX in den RKIP-Mäusen unverändert ist. Ein Maß für die Aktivität der SERCA2 ist die Phosphorylierung des endogenen Inhibitors Phospholamban (PLN). Eine erhöhte Phosphorylierung hat das Abdissoziieren des Inhibitors von der SERCA2 zur Folge und führt damit zur Erhöhung der Aktivität der SERCA2. Die Untersuchung der PLN-Phosphorylierung zeigte eine Erhöhung der Phosphorylierung und deutet somit auf einen beschleunigten Rücktransport des Calciums in das sarcoplasmatische Retikulum hin (siehe Schmid et al., 2015). Eine beschleunigte Relaxation ist damit eher durch die erhöhte Aktivität des SERCA2 als durch das vermehrte Vorhandensein der Transporter zu erklären.

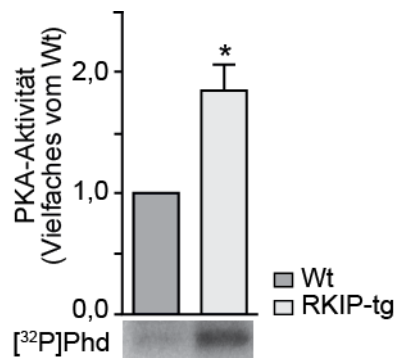
In Abbildung 3.9 ist die Expression der wichtigsten kardialen Calciumkanäle, des RyR2 (links) und des LTCC auch Ca<sub>v</sub>1.2 genannt (rechts), dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass die erhöhten Calciumamplituden nicht durch ein vermehrtes Vorkommen der beiden Kanäle bedingt sind. Für eine differenziertere Untersuchung der erhöhten Calciumamplituden muss deshalb auch die Aktivität berücksichtigt werden. Die Aktivität dieser beiden Kanäle wird im Kapitel 3.7 näher betrachtet.



**Abbildung 3.9:** Analyse der Expression des RyR2 und des Ca<sub>v</sub>1.2. Repräsentative *Western Blots* und entsprechende Quantifizierungen des RyR2 (links) und des Ca<sub>v</sub>1.2 (rechts) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=7 im Fall des RyR2 und n=6 im Fall des Ca<sub>v</sub>1.2. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.  $p < 0,05$ .

### RKIP führt zu einer vermehrten PKA-Aktivierung in adulten Kardiomyozyten

Im Hinblick auf die erhöhte Aktivität der PKA in RKIP überexprimierenden neonatalen Kardiomyozyten in Abbildung 3.3 sollte die Aktivität dieser für die Kontraktilität entscheidenden Kinase auch *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden die Lysate von Wt und RKIP-tg isolierten adulten Kardiomyozyten in einem Phosphorylierungsassay inkubiert und die Phosphorylierung des PKA-Substrats Phosducin untersucht.



**Abbildung 3.10:** PKA-Aktivität in Herzlysaten. Repräsentative Autoradiografie und Quantifizierung der Phosducin-Phosphorylierung in Lysaten von Wt und RKIP-tg Mäusen. Der Wt wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber dem Wt;  $p < 0,05$ .

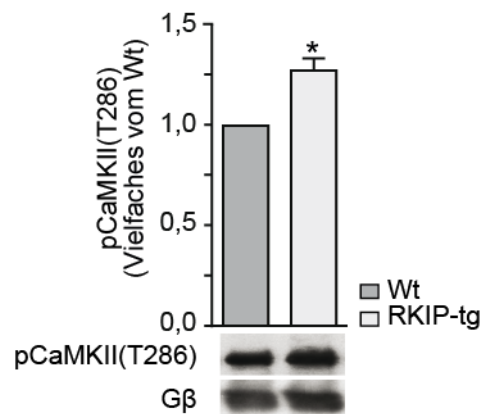
Der Graph und die zugehörige Autoradiografie zeigen, dass die Aktivität der PKA in den RKIP-überexprimierenden Mäusen auf das Doppelte erhöht ist. Dies ist ein weiteres

Indiz dafür, dass die  $\beta$ AR Rezeptoren verstärkt aktiviert sind.

### RKIP erhöht die Aktivität der kardialen CaMKII

Neben der PKA ist die CaMKII eine weitere wichtige Kinase, die durch  $\beta$ -adrenerge Signalwege aktiviert wird. Wie der Name andeutet ist sie Calcium-abhängig, so dass der Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol in Folge der  $\beta$ -adrenergen Aktivierung zu einer Erhöhung der Phosphorylierung an Threonin 186 führt, welche ein Maß für die Aktivität der Kinase ist (Erickson, 2014).

In Abbildung 3.11 ist der Immunoblot der CaMKII-Phosphorylierung gezeigt. Im Vergleich zum Wildtyp führt die Überexpression von RKIP zu einer erhöhten CaMKII Aktivierung. Da die PKA und die CaMKII mit positiver Inotropie aber auch mit der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose assoziiert sind, ist es wichtig den Einfluss der einzelnen Kinasen auf ihre Phosphorylierungssubstrate zu untersuchen. In Kapitel 3.8 wird der Phosphorylierungsstatus der Stellen spezifisch für PKA und CaMKII an RyR2 und LTCC näher untersucht.

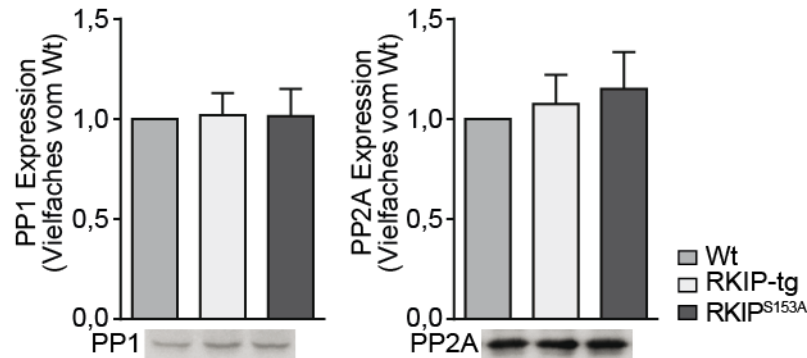


**Abbildung 3.11:** CaMKII-Aktivität in Herzlysaten. Repräsentativer *Western Blot* und Quantifizierung der CaMKII-Autophosphorylierung an Threonin 286 (Antikörper: pCaMKII (T286); G $\beta$ ) als Maß der Kinaseaktivität in Herzlysaten von Wt und RKIP-transgenen Mäusen. Der Wt wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=6. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.  $p < 0,05$ .

### RKIP nimmt keinen Einfluss auf die Expression kardialer Phosphatasen

Abgesehen von dem Einfluss der Kinasen, die zu einer vermehrten Phosphorylierung von Kontraktions-assoziierten Proteinen führen, können ebenso kardiale Phosphatasen Einfluss auf das Maß der Phosphorylierung und damit die Kontraktilität haben. Wichtige

Phosphatasen im Herzen sind PP1 und PP2A, die im Zytosol lokalisiert sind (Weber et al., 2015). Daher sollte untersucht werden ob RKIP Einfluss auf die Expression dieser Phosphatasen nimmt.



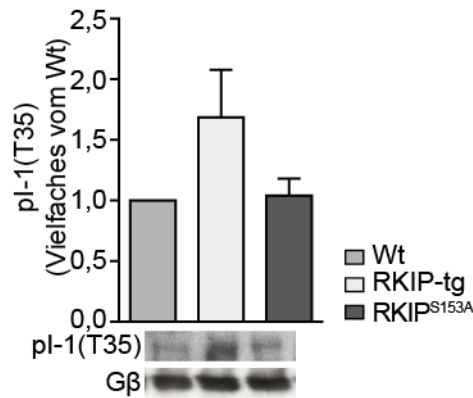
**Abbildung 3.12:** Analyse der Expression der PP1 und PP2A. Repräsentativer *Western Blot* und entsprechende Quantifizierung der Protein Phosphatase 1 (links) und der Protein Phosphatase 2A (rechts) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Der Wt wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=7. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.  $p < 0,05$ .

Die Expression wurde durch spezifische Antikörper gegen PP1 oder PP2A mittels *Western Blot* analysiert. In Abbildung 3.12 sieht man weder bei PP1 (links) noch bei PP2A (rechts) einen Unterschied bei der Analyse der Herzlysate von Wildtypen, RKIP-transgenen und der phosphoryierungsdefizienten RKIP<sup>S153A</sup>-Mutante. Dies bedeutet, dass die Überexpression von RKIP keinen Einfluss auf die Expression dieser beiden Phosphatasen im Herzen hat. Ferner kann angenommen werden, dass die Substratphosphorylierung in RKIP-tg durch die Aktivität der Kinase bestimmt ist.

### Der Einfluss des RKIP auf die PP1-Inhibitor (I-1) Phosphorylierung

Die Aktivität der PP1 wird durch ein inhibitorisches Protein, den Inhibitor 1 (I-1) reguliert (Wittköpper et al., 2011). Eine PKA-vermittelte Phosphorylierung an Threonin 35 führt zur Aktivierung des Inhibitors und zum Abdissozieren des Inhibitors von PP1. Eine vermehrte Phosphorylierung des I-1 bedeutet somit eine erhöhte Aktivität der PP1. Um Aufschluss über die Aktivität der PP1 zu bekommen wurde deshalb die Phosphorylierung des I-1 untersucht.

In Abbildung 3.13 sieht man die *Western Blot* Analyse des Phosphorylierungsstatus des I-1. Der Vergleich der drei Genotypen (Wt, RKIP, RKIP<sup>S153A</sup>) zeigt, dass die Phospho-



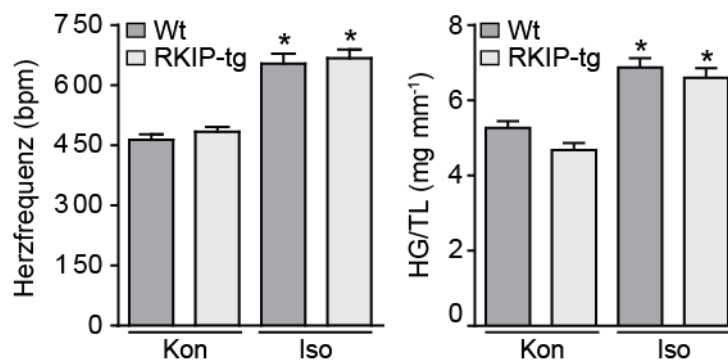
**Abbildung 3.13:** Aktivität des Phosphatase Inhibitors 1 (I-1) in Herzlysaten. Repräsentativer *Western Blot* und Quantifizierung der I-1 Phosphorylierung an Threonin35 (Antikörper: pDAR-PP32 (T34); Detektion des pI-1 (T35) nach El-Armouche et al., 2004) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Der Wt wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus n=12. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.  $p < 0,05$ .

rylierung des Inhibitors nur in Herzlysaten von RKIP-transgenen Mäusen leicht aber nicht signifikant erhöht ist.

Eine erhöhte Expression von RKIP hat eine Verstärkung  $\beta$ -adrenerger Signalwege zur Folge. Dieses zeigt sich *in vitro* in höheren cAMP-Maxima, erhöhter PKA-Aktivität und einer höheren Kontraktionsrate. *In vivo* kann man zusätzlich eine Erhöhung der Calciumamplitude in der Systole und eine erhöhte Calciumbeladung des sarkoplasmatischen Retikulums beobachten. Das veränderte Calcium-*Cycling* ist dabei nicht von der Expression der Calcium-verarbeitenden Kanäle und Transporter abhängig. Neben der PKA zeigt sich auch eine Erhöhung der CaMKII-Aktivität und gleichzeitig eine Erhöhung der PP1-Aktivität bei gleichbleibender Phosphatase-Expression. Um den Phänotyp der RKIP-transgenen Tiere vor allem in Hinblick auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege weiter aufzuklären wurden die Tiere in Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen untersucht.

### 3.3 Effekte der RKIP-Expression unter Aktivierung der $\beta$ AR mit Isoprenalin

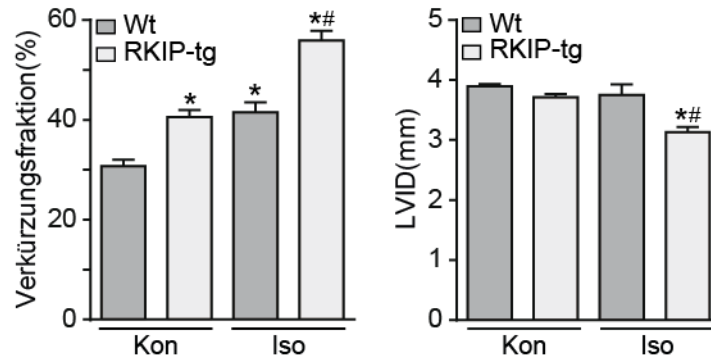
Die chronische Aktivierung der  $\beta$ AR Rezeptoren führt zunächst zu einer positiv inotropen, lusitropen und dromotropen Antwort des Herzens. Längerfristig wirkt sich die Kontraktilitätsteigerung über diesen Weg jedoch negativ aus, in dem es durch die GRK2 zu einer Desensitivierung der kardialen  $\beta$ AR kommt und somit das Herz in seiner Erregbarkeit eingeschränkt wird. Weitere Mechanismen wie das pathologische Wachstum des Herzens (Hypertrophie) und die Vernarbung des Herzgewebes (Fibrose) sind Vorgänge die zur Verschlechterung der Herzfunktion beitragen (K. Singh et al., 2001). Um die Effekte von RKIP auf diese Mechanismen zu untersuchen, wurde ein Modell gewählt, bei dem durch die Implantation einer kleinen osmotischen Pumpe eine kontinuierliche Gabe von Isoprenalin gewährleistet wird. Isoprenalin ist ein Agonist an  $\beta$ AR, der unspezifisch auf  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR wirkt. Für diesen Versuch wurden RKIP-transgene Maus in einen C57BL/6J Hintergrund gekreuzt und bis zur Kongenität gezüchtet (Greenhouse et al., 1990). Erfahrungswerte zeigten, dass dieser Hintergrund sensibler auf die Induktion einer Herzinsuffizienz reagiert (experimentelle Erfahrung von Prof. Dr. K. Lorenz, Daten werden nicht gezeigt). Die nachfolgend gezeigten Daten zur chronischen Isoprenaliningabe sind im Rahmen meiner Diplomarbeit (2011) entstanden.



**Abbildung 3.14:** Analyse der Herzfrequenz und des Herzgewichts. Dargestellt ist die echokardiografische Analyse der Herzfrequenz (links) (Mittelwert aus Wt Kon, RKIP-tg Iso n=8, Wt Iso n=10, RKIP-tg n=9 in bpm entspricht Herzschlägen pro Minute) und die Analyse des Herzgewichts in Relation zur *Tibia*-Länge (Mittelwert aus Wt Kon, RKIP-tg Kon n=8, Wt Iso n=5, RKIP-tg Iso n=7 in mg/mm) in Wildtyp (Wt) und RKIP-transgenen (RKIP-tg) Mäusen basal (Kon) und nach kontinuierlicher vierwöchiger Verabreichung von 30mg/d/kg Körpergewicht Isoprenalin (Iso). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber der basalen Bedingung (Kon);  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.14 sieht man, dass durch die Verabreichung von Isoprenalin eine zu

erwartende Erhöhung der Herzfrequenz erfolgt. Diese ist unabhängig vom Genotyp der Mäuse und zeigt in Wt sowie in RKIP-tg eine ähnliche Erhöhung. Auch die durch die Isoprenalininfusion induzierte Hypertrophie des Herzens hat in beiden Genotypen ein ähnliches Ausmaß. Um die Funktionsweise des Herzens weiter zu untersuchen, wurden durch Echokardiografie gewonnene Parameter herangezogen.



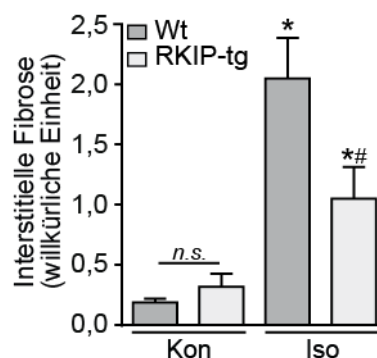
**Abbildung 3.15:** Analyse des Kontraktionsvermögens und der Dilatation des linken Ventrikels. Dargestellt sind echokardiografische Parameter der Verkürzungsfraction (links, in %) und des linksventrikularen Innendurchmessers (LVID, rechts; in mm) des Herzens in Wildtypen und RKIP-transgenen Tieren vor und nach kontinuierlicher vierwöchiger Verabreichung von 30mg/d/kg Körpergewicht Isoprenalin. Mittelwert aus Wt Kon, RKIP-tg Iso n=8, Wt Iso n=10, RKIP-tg n=9. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber Wt Kon; # signifikant gegenüber Wt Iso;  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.15 (links) ist die Verkürzungsfraction des Herzens dargestellt. Diese wird aus dem Innendurchmesser des Ventrikels in der maximalen Diastole und Systole berechnet. Der sich ergebende Wert ist ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens, d.h. eine starke Kontraktion zeichnet sich durch eine hohe Verkürzungsfraction aus eine schwache Kontraktion durch eine niedrige. Hier zeigt sich, dass die erhöhte RKIP Expression im Herzen schon vor der Isoprenalininfusion d.h. unter basalen Bedingungen eine verstärkte Kontraktion verursacht. Durch die Isoprenalingabe wird die Kontraktilität beider Genotypen in ähnlichem Maße erhöht. Dies ist durch die aktivierende Wirkung des Isoprenalin auf die  $\beta$ AR bedingt. Zu bemerken ist, dass die RKIP-transgenen Tiere auch nach Gabe von Isoprenalin noch eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Kontraktion zeigen, was auf eine additive Wirkung der Kontraktions-steigernden Mechanismen hinweist und damit das Vorhandensein einer Reserve bestätigt.

Die Dilatation (Abbildung 3.15, rechts) des linken Ventrikels stellt ein Maß der Flexibilität des Herzmuskels dar. Eine bleibende Dilatation des Herzmuskels kann durch Vernarbung auftreten und führt zu einem Funktionsverlust des Herzens. Unter basa-

len Bedingungen besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen. Auch beeinflusst die Isoprenalininfusion die Dilatation des Herzmuskels im Wildtypen kaum. Die RKIP-transgenen Tiere zeigen hier jedoch verringerte Innendurchmesser und damit einen funktionsfähigeren Herzmuskel.

Die eben erwähnte Vernarbung oder auch Fibrosierung des Herzens kann durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden. Ein Nachweis für die Fibrosierung des Herzgewebes ist die Färbung von histologischen Schnitten mit Sirius Rot um das Kollagen sichtbar zu machen. Dafür wurden die Herzen nach der Entnahme fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Sirius-Rot gefärbt. Die Färbung wurde mittels Photoshop quantifiziert und als Anteil der gefärbten Pixel zur Gesamtzahl der Pixel dargestellt.



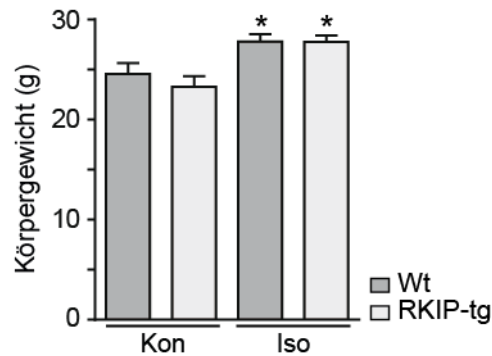
**Abbildung 3.16:** Analyse der interstitiellen Fibrose. Dargestellt ist die Quantifizierung einer Sirius-Rot-Färbung von histologischen Schnitten von Wildtypen (Wt) und RKIP-tg, ohne (Kon) und mit vierwöchiger Infusion von 30mg/d/kg Körpergewicht Isoprenalin (Iso). Die interstitielle Fibrose ist in einer willkürlichen Einheit bemessen und stellt den Anteil fibrotischen Gewebes am Gesamtgewebe innerhalb eines Herzschnittes dar. Mittelwert aus Wt Kon, Wt Iso n=8, RKIP-tg Kon n=7, RKIP-tg Iso n=6. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber Wt Iso;  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.16 sieht man, dass es durch die Isoprenalininfusion zu einer verstärkten Narbenbildung innerhalb des Herzmuskels kommt. Es zeigt sich jedoch auch, dass das Ausmaß dieser Fibrosierung in den RKIP-transgenen Mäusen kleiner ist. Dieses kann auch eine Erklärung für die unterschiedliche Dilatation des linken Ventrikels sein. Die Behandlung mit Isoprenalin stellt einen dramatischen Einfluss auf das Aktivitätsniveau der Mäuse dar. Dieses gesteigerte Aktivitätsniveau kann sich in einer Gewichtsreduktion zeigen. Aus diesem Grund sollte das Gewicht der Mäuse analysiert werden.

Abbildung 3.17 zeigt, dass sich das Körpergewicht der Mäuse unabhängig vom Genotyp mit dem steigendem Alter entwickelt.

Durch die andauernde Isoprenalingabe kann die Auswirkung der RKIP-Expression auf



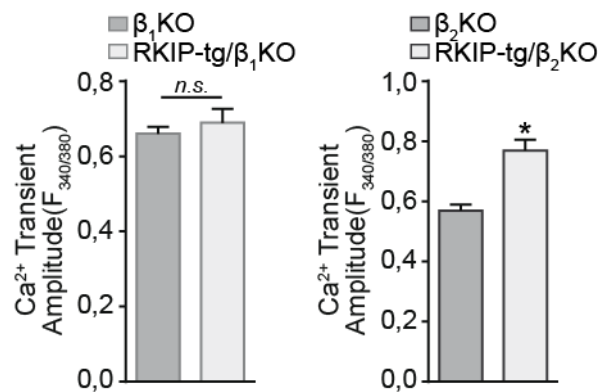


**Abbildung 3.17:** Analyse des Körpergewichts. Dargestellt ist das Körpergewicht (in g) von Wildtypen (Wt) und RKIP-transgenen (RKIP-tg) Mäusen vor (Kon) und nach kontinuierlicher vierwöchiger Verabreichung von 30mg/d/kg Körpergewicht Isoprenalin (Iso). Mittelwert aus Wt Kon, Wt Iso n=9, RKIP-tg Kon n=7, RKIP-tg Iso n=8. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon);  $p < 0,05$ .

die  $\beta$ AR-Aktivierung untersucht werden. Einerseits gibt dieses Modell Aufschluss über Unterschiede in der Hypertrophieentstehung und Fibrosierung des Herzens, andererseits können auch Aussagen über die Funktionalität des Herzmuskels unter dem Stress der andauernden  $\beta$ -adrenergen Signale getroffen werden. Im Bezug auf RKIP zeigt sich, dass die Überexpression eine positiv inotrope Wirkung unter basalen sowie Stressbedingungen hat. Gleichzeitig zeigt sich eine verringerte Fibroseentwicklung in der RKIP transgenen Mäusen, während die Hypertrophie des Herzens in beiden Genotypen ein ähnliches Ausmaß besitzt.

### 3.4 Einfluss des RKIP auf die Kontraktilität in Abhängigkeit des $\beta_1$ AR und $\beta_2$ AR

Da die kontraktile Funktion des Herzens von den  $\beta$ AR beeinflusst wird und sich im Isoprenalinmodell eine additive Wirkung der RKIP- und Isoprenalinwirkung gezeigt hat, sollten weitere Calciummessungen zur Untersuchung der Kontraktilität in Abhängigkeit der abundantesten  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen erfolgen. Es sollten die Einflüsse des  $\beta_1$  AR und des  $\beta_2$  AR differenziert betrachtet werden. Dazu wurden die schon in Abbildung 3.1 eingeführten Mäuse verwendet, die eine Kreuzung aus den RKIP transgenen und homozygoten *Knockouts* des jeweiligen Rezeptors ( $\beta_1$ AR oder  $\beta_2$ AR). Für die Calciummessungen wurden adulte Kardiomyozyten isoliert und die Calciumtransienten mit Hilfe des calciumsensitiven Farbstoffs Fura-2 aufgezeichnet.



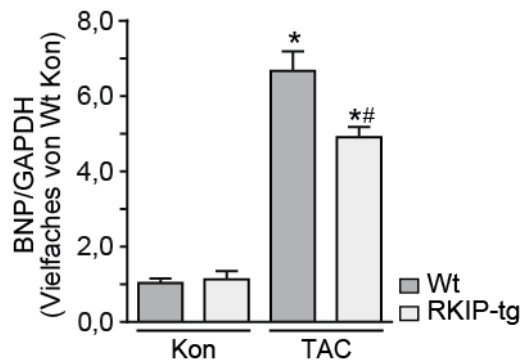
**Abbildung 3.18:** Untersuchung der Calciumtransienten in Abhängigkeit des  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR. Dargestellt ist die Amplitude (F<sub>340/380</sub>) der spannungsinduzierten (20 V; 0,5 Hz) Calciumtransienten in  $\beta_1$ KO und RKIP/ $\beta_1$ KO (links; Mittelwert aus  $\beta_1$ KO n=10, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO n=9) sowie des  $\beta_2$ KO und des RKIP-tg/ $\beta_2$ KO (rechts;  $\beta_2$ KO n=8 RKIP-tg/ $\beta_2$ KO n=9). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber  $\beta_2$ KO; p < 0,05. Diese Daten wurden von Julia Becker und Markus Weidendorfer erstellt.

Wie zuvor wurde auch hier die Amplitude des Calciumtransienten herangezogen, da sie die maximalen Calciumspiegel während der Systole im Zytosol beschreibt. Es wird deutlich, dass im Gegensatz zum Wildtyp-Hintergrund, bei Fehlen des  $\beta_1$ AR (Abbildung 3.18, links) der vorher beobachtete Kontraktilitäts-steigernde Phänotyp von RKIP nicht mehr zu sehen ist, d.h. es gibt keinen Unterschied in der Calciumamplitude zwischen RKIP/ $\beta_1$ KO und  $\beta_1$ KO Tieren. Im Vergleich dazu verhält sich RKIP bezüglich der Calciumamplitude im  $\beta_2$ KO Hintergrund (Abbildung 3.18, rechts) ähnlich wie im Wildtyp-Hintergrund. Auch hier zeigen die RKIP-tg (RKIP/ $\beta_2$ KO) eine höhere Calci-

umamplitude im Vergleich zu den reinen  $\beta_2$ KO. Durch diesen Umstand kann die positiv inotrope Wirkung der RKIP-Überexpression, dem  $\beta_1$ AR zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu und im Einklang mit der Literatur (Bristow et al., 1986) ist der  $\beta_2$ AR für die Kontraktilitäts-Steigerung durch RKIP von geringerer Bedeutung.

### 3.5 Einfluss von RKIP auf die kardiale Fibrosierung und die Transkription des Herzinsuffizienzmarkers BNP

In dem Isoprenalinmodell, das als ein Hypertrophiemodell betrachtet werden kann, konnte bereits ein antifibrotischer Effekt der RKIP-Überexpression beobachtet werden (Abbildung 3.16). Dies ist ein protektiver Effekt, da eine voranschreitende Fibrosierung des Herzens die Elastizität und damit die Kontraktilität beeinträchtigt. Dieser Effekt sollte nun in einem Herzinsuffizienzmodell näher betrachtet werden. Durch eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) wurde die Nachlast des Herzens erhöht. Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass eine Nachlasterhöhung einen gesteigerten sympathischen Tonus induziert und eine Herzinsuffizienz verursacht (Rockman et al., 1991). Mit Hilfe dieses Modells sollte der Einfluss von RKIP auf die Herzinsuffizienzentwicklung untersucht werden. Wie schon zuvor in dem Isoprenalinmodell wurden auch hier der C57BL/6J Hintergrund gewählt, da er sensitiver auf dieses Krankheitsmodell reagiert (experimentelle Erfahrung von Prof. Dr. K. Lorenz, Daten werden nicht gezeigt).

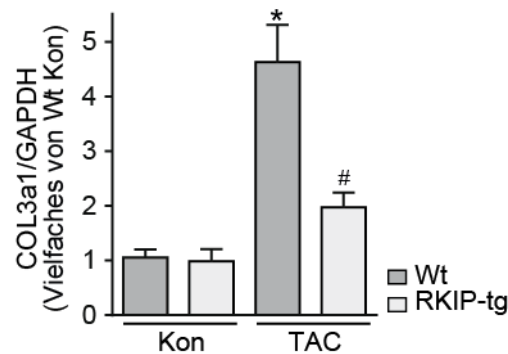


**Abbildung 3.19:** Untersuchung der Expression des *Brain natriuretic peptides* (BNP). Quantifizierung der mRNA-Level von BNP relativ zum basalen Wildtyp (Wt Kon wurde als 1 gesetzt), über eine rtPCR Analyse in Wt und RKIP-tg unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert des  $2^{\Delta\Delta C_t}$  aus Wt Kon n=6, RKIP-tg Kon, Wt TAC n=5, RKIP-tg TAC n=3. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber Wt TAC;  $p < 0,05$ . Diese Daten wurden von Katrin Kahlert erstellt.

Die Expression des BNP stellt einen Marker für das Ausmaß der Herzinsuffizienz dar. Je höher die Expression dieses Peptides ist, desto gravierender ist die Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998; Kehat und Molkentin, 2010). In Abbildung 3.19 sieht man, dass die Wildtyp sowie die RKIP-tg Mäuse unter Kontrollbedingungen ähnliche BNP-mRNA Level zeigen. Nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion nimmt diese in beide Genotypen zu.

Jedoch ist das Ausmaß der Zunahme in den Wt größer als in den RKIP-tg.

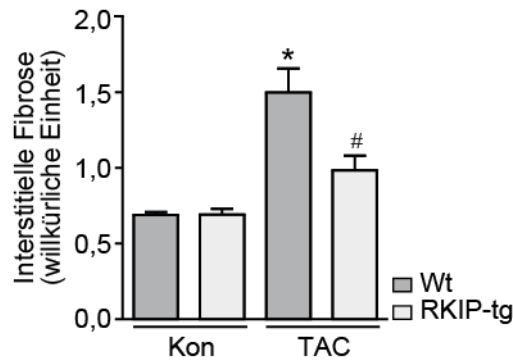
Ein weiterer Marker, dessen Expression durch eine rtPCR quantifiziert wurde, war das KollagenIII $\alpha$ 1. Dieses Protein ist neben anderen Kollagenen Bestandteil des Bindegewebes und steigt an, wenn es zur Vernarbung bzw. zur Entwicklung einer interstitiellen Fibrose kommt. Eine Ursache dafür ist das Absterben von Kardiomyozyten.



**Abbildung 3.20:** Untersuchung der Expression des KollagenIII $\alpha$ 1. Quantifizierung der mRNA-Level von *Col3a1* relativ zum basalen Wildtyp (Wt Kon wurde als 1 gesetzt), über eine rtPCR Analyse in Wt und RKIP-tg unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert des  $2^{\Delta\Delta C_t}$  aus Wt Kon n=7, RKIP-tg Kon n=4, Wt TAC n=7, RKIP-tg TAC n=5. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon) # signifikant gegenüber Wt TAC;  $p < 0,05$ . Diese Daten wurden von Katrin Kahlert erstellt.

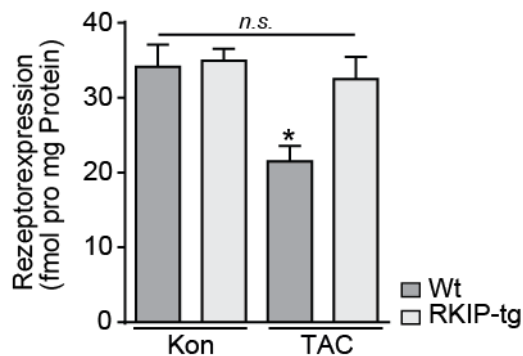
Abbildung 3.20 zeigt die Analyse der KollagenIII $\alpha$ 1 Expression. Hier sieht man ein ähnliches Profil wie das des BNP bei dem es basal keine Unterschiede gibt. Mit Entstehung der interstitiellen Fibrose und fortschreitender Herzinsuffizienz steigt die Expression an (Spinale, 2007; Burchfield et al., 2013). Dieser Anstieg ist im Wt stärker als in den RKIP-tg. Auch dies bestätigt ein geringeres Ausmaß der Herzinsuffizienz und eine protektive Wirkung des RKIP.

Auch für dieses Modell wurde die histologische Untersuchung der interstitiellen Fibrose mittels Sirius Rot zur Anfärbung der Kollagenfasern gewählt. Die Analyse dieser Färbung zeigt eine deutliche Erhöhung der interstitiellen Fibrose im Wt nach TAC. Diese fällt, ähnlich wie schon die Expressionsanalyse des KollagensIII $\alpha$ 1, in RKIP-tg Mäusen geringer aus. Die Entwicklung der Fibrose ist somit in RKIP-Tieren verringert.



**Abbildung 3.21:** Untersuchung der interstitiellen Fibrose. Quantifizierung einer Sirius-Rot-Färbung von histologischen Paraffinschnitten in Wt und RKIP-tg unter basalen (Kon) Bedingungen und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Die interstitielle Fibrose ist in einer willkürlichen Einheit bemessen und stellt den Anteil fibrotischen Gewebes am Gesamtgewebe innerhalb eines Herzschnittes dar. Aufgetragen ist der Mittelwert aus Wt Kon n=7, RKIP-tg Kon n=10, Wt TAC n=16, RKIP-tg TAC n=12. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber Wt TAC;  $p < 0,05$ . Diese Daten wurden von Katrin Kahlert erstellt.

Ein Mechanismus, der eine andauernde Aktivierung der  $\beta$ AR verhindern soll, ist die Desensitivierung und nachfolgende Degradation der Rezeptoren durch GRK. Dies bewirkt eine geringere Erregbarkeit des Kardiomyozyten und spricht im Allgemeinen einer Regulierbarkeit der Kontraktionsfähigkeit entgegen (Bristow et al., 1982; Bristow et al., 1989; Bristow et al., 1993). Durch die Analyse der Rezeptordichte im Herzinsuffizienzmodell kann zum einen eine Aussage über die inhibitorische Wirkung von RKIP auf die GRK und zum anderen das Ausmaß der Herzinsuffizienz bewertet werden.



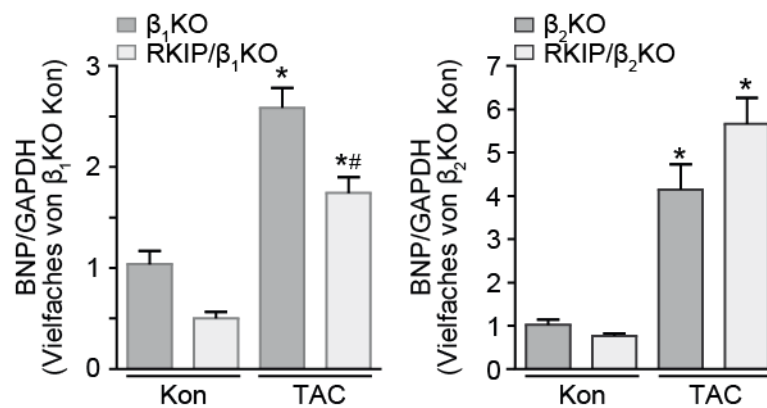
**Abbildung 3.22:** Dichte der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren. Analyse der Rezeptordichte in Kardiomyozytenmembranen mittels Auswertung der maximalen Rezeptorbindung des Radioliganden  $^{125}$ I-Cyanopindolol in fmol/mg Protein in Wt und RKIP-tg unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert aus Wt Kon n=6, RKIP-tg Kon n=4, Wt TAC n=5, RKIP-tg TAC n=4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); *n.s.* nicht signifikant;  $p < 0,05$ .

In Abbildung 3.22 sieht man die Analyse der Rezeptordichte in Kardiomyozytenmembranen. Diese wurde aus der maximalen Bindung des Radioliganden  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol errechnet. Man erkennt hier keine Unterschiede zwischen Wt und RKIP-transgenen Mäusen unter basalen Bedingungen. Die Aortenkonstriktion bewirkt im Wt eine Verringerung der Rezeptordichte, die durch die Internalisierung, Degradation und Reduktion der Rezeptorexpression verursacht wird. Im Gegensatz dazu bleibt die Rezeptordichte in den RKIP-transgenen Mäusen auch nach Aortenkonstriktion unverändert. Die RKIP-tg Mäuse sind gegenüber dem GRK-vermittelten Verlust der Rezeptoren geschützt. Der primäre Grund ist die Inhibition der GRK durch die vermehrte Expression des RKIP. Ein sekundärer Effekt ist die bessere Konstitution des Herzens die mit den höheren Rezeptorspiegeln einhergeht.

Diese Experimente zeigen, dass RKIP einige Effekte der Herzinsuffizienz verringern kann. Die RKIP-transgenen Mäuse haben weniger Fibrose und zeigen eine geringere Expression des Fibrosemarkergens KollagenIII $\alpha$ 1. Auch der Herzinsuffizienzmarker BNP wird weniger exprimiert. Die gleichbleibende Dichte der  $\beta$ AR kann sich vorteilhaft auf die Ansprechbarkeit des Herzens auswirken.

### 3.6 Einfluss des RKIP auf die Umstrukturierung in Abhängigkeit des $\beta_1$ AR und $\beta_2$ AR

Die in Kapitel 3.5 gezeigten Ergebnisse zeigen eine protektive Wirkung der gesteigerten RKIP-Expression. Die Untersuchung der Rezeptordichte legt dabei eine Beteiligung der  $\beta$ AR nahe, da die Verringerung dieser für die Entwicklung der Herzinsuffizienz mitverantwortlich ist und RKIP in der Lage ist diese zu verhindern. Aus diesem Grund sollte der protektive Phänotyp in Abhängigkeit des  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR untersucht werden. Dafür wurden, wie schon in den Kontraktionsversuchen in Kapitel 3.4, die  $\beta_1$ KO und  $\beta_2$ KO Mäuse verwendet. Diese wurden aufgrund des FVB/N-Hintergrundes einer sechswöchigen Aortenkonstriktion unterzogen und auf die in Kapitel 3.5 beschriebenen Marker untersucht.

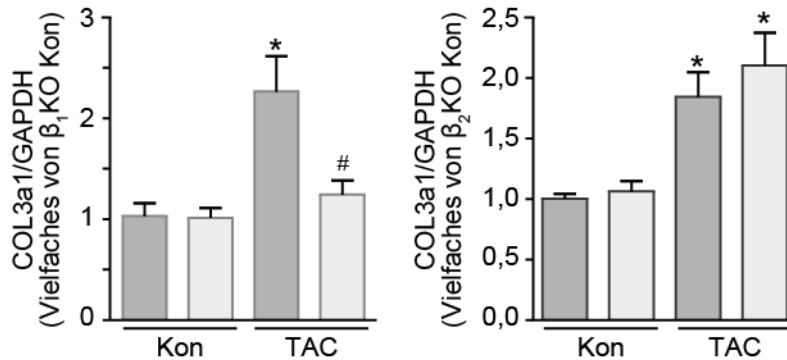


**Abbildung 3.23:** Untersuchung der Expression des *Brain natriuretic peptides* (BNP). Quantifizierung der mRNA-Level von BNP relativ zum basalen Wildtypen (Wt Kon wurde auf 1 gesetzt), über eine rtPCR Analyse. Verglichen werden  $\beta_1$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_1$ KO (links) und  $\beta_2$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_2$ KO (rechts) unter basalen Bedingungen (Kon) und nach sechswöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert des  $2^{\Delta\Delta C_t}$  aus  $\beta_1$ KO Kon n=5, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO Kon n=4,  $\beta_1$ KO TAC n=6, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO TAC n=5 und  $\beta_2$ KO Kon n=4, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO Kon n=6,  $\beta_2$ KO TAC n=6, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO TAC n=10. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon) # signifikant gegenüber  $\beta_1$ KO TAC;  $p < 0,05$ . In Zusammenarbeit mit Daniel Becker, Nadine Hemmrich und Martina Fischer.

In Abbildung 3.23 sieht man die Expression des Herzinsuffizienzmarkers BNP. Auch in den KO Hintergründen zeigt sich kein Unterschied unter basalen Bedingungen. Nach der Aortenkonstriktion sieht man jedoch, dass die Protektion durch RKIP nur im  $\beta_1$ KO Hintergrund vorhanden ist. Im  $\beta_2$ KO zeigt RKIP keine protektive Wirkung. Hier zeigt sich eher eine gegenteilige Wirkung, so dass die gesteigerte RKIP-Expression zu einer



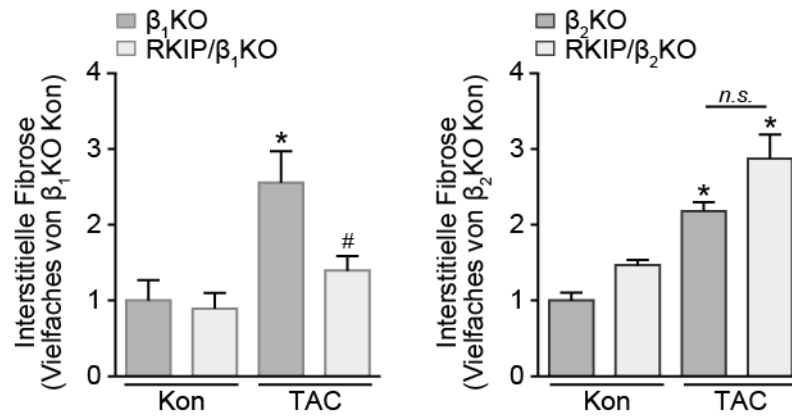
nicht signifikanten Erhöhung der BNP-Expression führt.



**Abbildung 3.24:** Untersuchung der Expression des KollagenIII $\alpha$ 1. Quantifizierung der mRNA Level von Col3a1 relativ zum basalen Wildtypen (Wt Kon wurde auf 1 gesetzt), über eine rtPCR Analyse. Verglichen werden  $\beta_1$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_1$ KO (links) und  $\beta_2$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_2$ KO (rechts) unter basalen Bedingungen (Kon) und nach sechswöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert des  $2^{\Delta\Delta C_t}$  aus  $\beta_1$ KO Kon n=5, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO Kon n=4,  $\beta_1$ KO TAC n=6, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO TAC n=5 und  $\beta_2$ KO Kon n=4, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO Kon n=6,  $\beta_2$ KO TAC n=6, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO TAC n=10. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon) # signifikant gegenüber  $\beta_1$ KO TAC;  $p < 0,05$ . In Zusammenarbeit mit Daniel Becker, Nadine Hemmrich und Martina Fischer.

Die Analyse der KollagenIII $\alpha$ 1 Expression in Abbildung 3.24 zeigt auch hier einen rezep-torspezifischen Phänotyp. Die gesteigerte Expression von RKIP führt nur im  $\beta_1$ KO Hin-tergrund zu einer Inhibition der Kollagenexpression, während diese Wirkung des RKIP im RKIP/ $\beta_2$ KO Tieren ausbleibt. Betrachtet man die Kollagenexpression im Zusam-menhang mit der histologischen Untersuchung der Herzen mittels Sirius-Rot-Färbung in Abbildung 3.25 zeigt sich eine verminderte interstitielle Fibrose in den RKIP/ $\beta_1$ KO, aber nicht den RKIP/ $\beta_2$ KO Tieren. Der Mechanismus der Inhibition der Fibrose hängt dementsprechend von den Signalen des  $\beta_2$ AR ab.

Neben dem kontraktiven Phänotyp der eine Abhängigkeit gegenüber dem  $\beta_1$ AR zeigt wurde durch die Charakterisierung der Herzinsuffizienzentwicklung in RKIP-transgenen Mäusen in den KO Hintergründen eine Abhängigkeit des protektiven Phänotyps gegen-über dem  $\beta_2$ AR gezeigt. Somit zeigt sich, dass die RKIP Phänotypen von den RKIP/ $\beta$ AR abhängen, deren Signalwege gleichzeitig von RKIP verstärkt werden.



**Abbildung 3.25:** Untersuchung der interstitiellen Fibrose. Quantifizierung einer Sirius-Rot-Färbung von histologischen Paraffinschnitten in Relation zum jeweiligen  $\beta_1$ KO oder  $\beta_2$ KO unter basalen Bedingungen (Kon) (Diese wurden jeweils auf 1 gesetzt). Verglichen werden  $\beta_1$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_1$ KO (links) und  $\beta_2$ KO mit RKIP-tg/ $\beta_2$ KO (rechts) unter basalen Bedingungen (Kon) und nach sechswochiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert aus  $\beta_1$ KO Kon n=5, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO Kon n=5,  $\beta_1$ KO TAC n=11, RKIP-tg/ $\beta_1$ KO TAC n=10 und  $\beta_2$ KO Kon n=5, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO Kon n=7,  $\beta_2$ KO TAC n=6, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO TAC n=9. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber  $\beta_1$ KO TAC; n.s. nicht signifikant;  $p < 0,05$ . Diese Daten wurden von Daniel Becker erstellt.

### 3.7 Einfluss von RKIP auf die Häufigkeit von Extrasystolen

Die Grundlage von Arrhythmien können Fehler in der Erregungsleitung, fehlerhafte Funktion der Schrittmacherzellen und Unregelmäßigkeiten im Calcium-Cycling in Kardiomyozyten sein. Neben anderen Arrhythmieformen stehen besonders die Extrasystolen in Verbindung mit spontanen Calciumströmen, die außerhalb der normalen Systole stattfinden. Durch die Analyse der Häufigkeit von Extrasystolen sollte Aufschluss über diese spontanen Calciumströme erhalten werden. Dies ist außerdem dadurch begründet, dass Unregelmäßigkeiten im Calcium-Cycling zum Sterben der Zelle führen, welche den Verlust von Kontraktilität und die Ausbildung von Fibrose mit sich ziehen können (Swynghedauw, 1999). Es wurden Wt und RKIP-tg Tiere im FVB/N Hintergrund sowie die Kreuzung dieser in den  $\beta_2$ KO Hintergrund untersucht. Dazu wurden den Mäusen EKG-Sender implantiert mit deren Hilfe es möglich war, Tiere, die sich frei bewegen, zu untersuchen. Durch die Gabe von einem Isoprenalinbolus werden die  $\beta$ AR aktiviert und das Aufkommen von Arrhythmien gefördert.

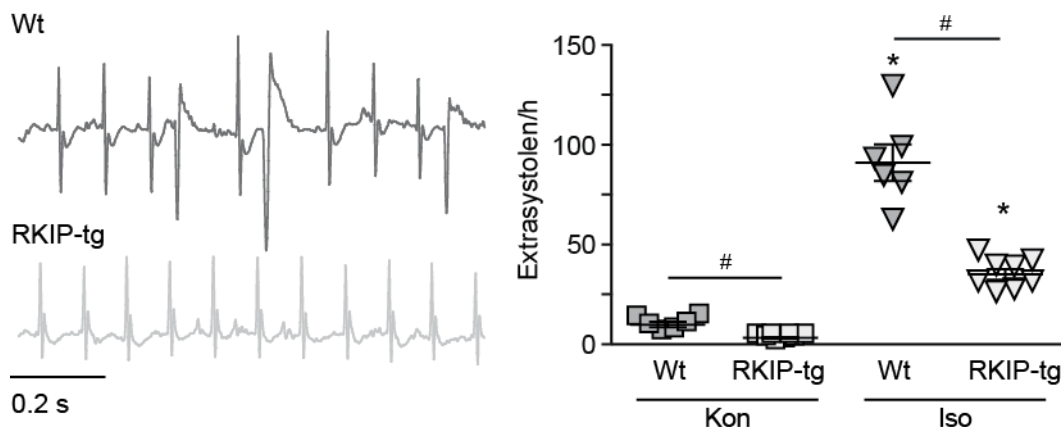
Um zu überprüfen, ob das Isoprenalin in den Mäusen wirkt, wurde die Herzfrequenz analysiert. In Tabelle 3.2 sieht man, dass die Gabe von Isoprenalin zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führt, welche in beiden Hintergründen und unabhängig von der RKIP-Expression erfolgt. Dabei ist zu beachten, dass die Tiere im FVB/N Hintergrund mit

100 $\mu$ g Isoprenalin behandelt wurden und die Tiere im  $\beta_2$ KO Hintergrund mit 50 $\mu$ g.

**Tabelle 3.2:** Analyse der Herzfrequenz (in bpm, entspricht Herzschlägen pro Minute) in Wt und RKIP-tg im FVB/N und im  $\beta_2$ KO-Hintergrund vor (Kontrolle) und nach der Gabe eines Isoprenalinbolus von 100 $\mu$ g im FVB/N- oder 50 $\mu$ g im  $\beta_2$ KO-Hintergrund (Isoprenalin). Angegeben ist der Mittelwert aus Wt n=6, RKIP-tg n=8 und  $\beta_2$ KO n=11, RKIP-tg/ $\beta_2$ KO n=9  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwerts. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kontrolle); p < 0,05.

Genotyp	Kontrolle		Isoprenalin	
	Wildtyp	RKIP	Wildtyp	RKIP
FVB/N	561 $\pm$ 11bpm	547 $\pm$ 19bpm	636 $\pm$ 10bpm*	629 $\pm$ 2,9bpm*
$\beta_2$ KO	549 $\pm$ 12bpm	561 $\pm$ 7,9bpm	675 $\pm$ 18bpm*	678 $\pm$ 9,9bpm*

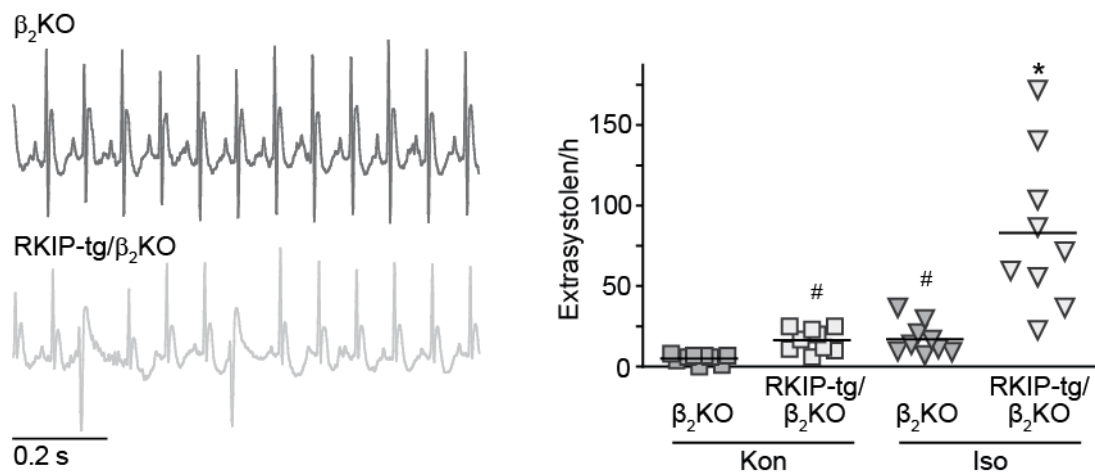
Abbildung 3.26 und 3.27 zeigen repräsentative EKG-Spuren und die Auswertungen dieser. Eine Extrasystole zeichnet sich dadurch aus, dass sie außerhalb des normalen Herzrhythmus geschieht und in ihrer Größe, Direktionalität und Form stark von der eines normalen Ausschlags abweicht (Miragoli et al., 2007). Für die Auswertung wurde eine Dauer von zwei Stunden gewählt.



**Abbildung 3.26:** Untersuchung der Häufigkeit von Extrasystolen. Repräsentative EKG-Spuren nach Isoprenalingabe (Iso) von 100 $\mu$ g (links) und Analyse der EKG-Spuren nach Extrasystolen pro Stunde in Wt und RKIP-tg im FVB/N Hintergrund vor (Kon) und nach der Gabe des Isoprenalinbolus (Iso) (rechts). Angegeben ist der Mittelwert aus Wt n=6, RKIP-tg n=8. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kontrolle); # zu Wt unter beiden Bedingungen. p < 0,05. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz und PD Dr. Peter Nordbeck.

In Abbildung 3.26 zeigt sich, dass die Erhöhung der RKIP-Expression zu einer Reduktion der Extrasystolen führt. Dieses gilt sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach

Gabe von Isoprenalin zur Induktion der Extrasystolen. Im Vergleich dazu kann man die Extrasystolen durch eine Steigerung der RKIP-Expression im  $\beta_2$ KO Hintergrund nicht reduzieren (siehe Abbildung 3.27). Wie schon in Kapitel 3.6 zeigt RKIP einen protektiven Phänotyp der von dem  $\beta_2$ AR abhängig ist. Weiterhin ist interessant, dass die Anzahl der Extrasystolen in den RKIP/ $\beta_2$ KO unter basalen Bedingungen sowie nach Isoprenalinabgabe signifikant erhöht ist im Vergleich zum jeweiligen  $\beta_2$ KO. Das weist darauf hin, dass der  $\beta_2$ AR einen proarrhythmischen Effekt des RKIP verhindert, so dass dieser nur bei Fehlen des  $\beta_2$ AR sichtbar wird.

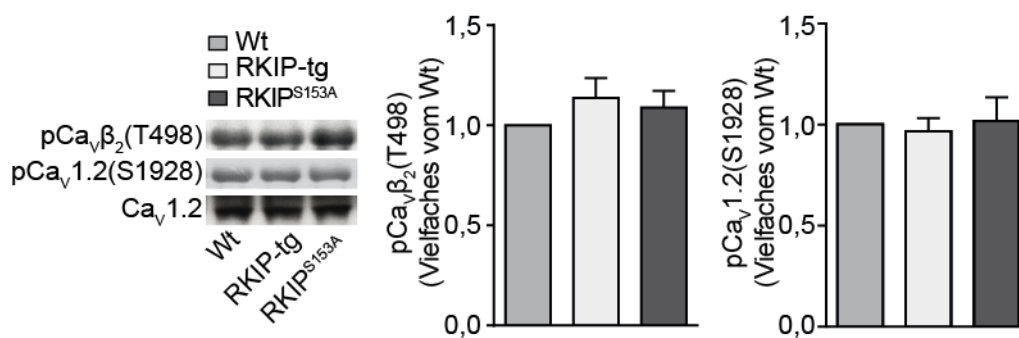


**Abbildung 3.27:** Untersuchung der Häufigkeit von Extrasystolen. Repräsentative EKG-Spuren nach Isoprenalinabgabe von 50 $\mu$ g (links) und Analyse der EKG-Spuren nach Extrasystolen pro Stunde in Wt und RKIP-tg im  $\beta_2$ KO Hintergrund vor (Kon) und nach der Gabe des Isoprenalinbolus (Iso; rechts). Angegeben ist der Mittelwert aus  $\beta_2$ KO und RKIP-tg/ $\beta_2$ KO n=9. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Bedingungen; # signifikant gegenüber  $\beta_2$ KO Kon mittels eines T-Tests; p < 0,05 In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz und PD Dr. Peter Nordbeck.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass der  $\beta_2$ AR eine zentrale Rolle bei der Vermittlung des RKIP-Phänotyps spielt. Eine Verstärkung der  $\beta$ AR-Signale wie sie durch RKIP hervorgerufen wird hat oftmals verheerende Auswirkungen. Im Falle des RKIP werden diese jedoch in Abhängigkeit des  $\beta_2$ AR verhindert. Dieses kann unter anderem daran liegen, dass der  $\beta_2$ AR als ein Gegenspieler des  $\beta_1$ AR fungiert. Eine gleichzeitige Verstärkung beider  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsignale, durch die Verhinderung der Desensibilisierung könnte so RKIP-Effekte erklären.

### 3.8 Effekte des RKIP auf die Ryanodin-Rezeptor und L-Typ-Calciumkanal-Phosphorylierung

Wie in Kapitel 3.2 erwähnt sind die beiden Kanäle, die die Kontraktion des Herzens vermitteln für das Calcium-*Cycling* von besonderer Bedeutung. Eine Fehlfunktion eines oder beider Kanäle kann daher dramatische Folgen für den Kardiomyozyten haben (Chen et al., 2005). Sehr wichtig ist dabei auch der Phosphorylierungsstatus der Kanäle, da dadurch die Offenwahrscheinlichkeit moduliert wird. Eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle kann zur spontanen Ausschüttung von Calcium in das Zytosol führen und Ursache für die in Kapitel 3.7 beschriebenen Arrhythmien und den Tod des Kardiomyozyten sein. Zentrale Kinasen in diesem Mechanismus sind die zuvor untersuchte PKA und CaMKII. Im Hinblick auf den LTCC sind zwei Phosphorylierungsstellen von Interesse. Zum einen das Threonin 498 der  $\beta$ -Untereinheit welches von der CaMKII phosphoryliert wird und zum anderen eine PKA-Phosphorylierungsstelle am Serin 1928 der  $\alpha$ Untereinheit (Bünemann et al., 1999; Striessnig et al., 2014). Für eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit sind beide Phosphorylierungsstellen von Bedeutung.

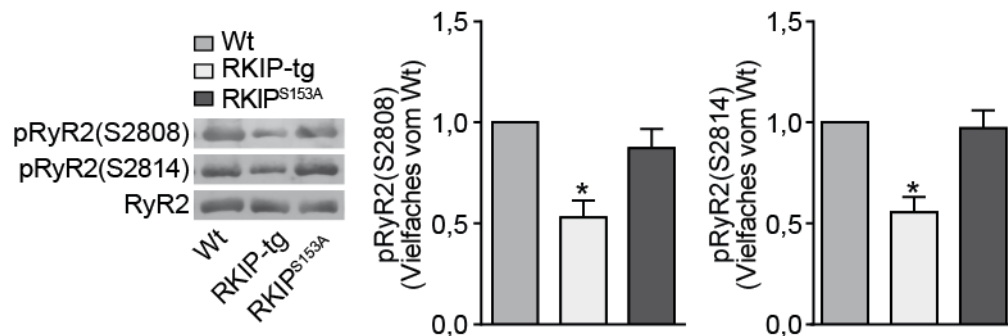


**Abbildung 3.28:** Aktivität des LTCC (Ca<sub>v</sub>1.2) in Herzlysaten. Repräsentative *Western Blots* und Quantifizierungen der LTCC-Phosphorylierung an Serin 1928 und Threonin 498 (Antikörper: pCa<sub>v</sub>1.2 (S1928); pCaMKII(T286) zur Detektion des pCa<sub>v</sub>β(T498) nach Grueter et al., 2008) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Angegeben ist der Mittelwert aus n=6, dabei wurde der Wt auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar.  $p < 0,05$ . In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz.

Die Abbildung 3.28 sieht man die Effekte der RKIP-Expression auf den Phosphorylierungsstatus. Man sieht weder an der PKA- noch an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle einen Unterschied zwischen den Genotypen. Dies zeigt, dass die Offenwahrscheinlichkeit des LTCC von der erhöhten RKIP-tg Expression unter basalen Bedingungen nicht beeinflusst wird.

Auch der RyR2 besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, die seine Aktivität beeinflus-

sen. In der Literatur werden die Funktionen der einzelnen Stellen und die ausführenden Kinasen stark diskutiert. Für die Untersuchung wurden die Phosphorylierungsstelle an Serin 2808 und Serin 2814 gewählt. Die Phosphorylierungsstelle an Serin 2814 ist durch die CaMKII verursacht und hat eine aktivitätssteigernde Wirkung auf den RyR2. Die Phosphorylierung an Serin 2808 ist umstritten. Sie kann unter anderen Kinasen auch von der PKA phosphoryliert werden, hat aber einen geringeren Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (Marx et al., 2000; Marks et al., 2002; Huke und Bers, 2008).



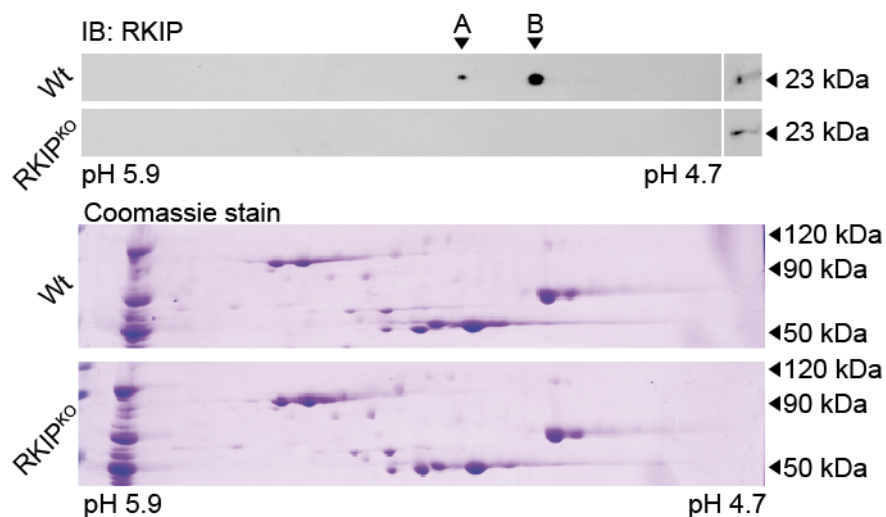
**Abbildung 3.29:** Aktivität des RyR2 in Herzlysaten. Repräsentative *Western Blots* und Quantifizierungen der RyR2-Phosphorylierung an Serin 2808 und Threonin 2814 (Antikörper: pRyR2 (S2808), pRyR2 (S2814)) in Lysaten von Wt, RKIP- und RKIP<sup>S153A</sup>-transgenen Mäusen. Angegeben ist der Mittelwert aus n=7, dabei wurde der Wt auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Genotypen; p < 0,05. Diese Daten wurden von Prof. Dr. Kristina Lorenz erstellt.

In Abbildung 3.29 sieht man die Phosphorylierung des RyR2. Diese wird durch die Expression des RKIP-Wildtyps nicht jedoch durch die phosphorylierungsdefiziente und GRK-inaktive Mutante verringert. Dies betrifft beide untersuchten Phosphorylierungsstellen. Die verringerte RyR2-Phosphorylierung sowie die unveränderte LTCC-Phosphorylierung sind sehr interessant und stehen auf den ersten Blick im Widerspruch mit der gesteigerten Aktivierung der phosphorylierenden Kinasen. Die in Kapitel 3.3 gezeigte leichte Steigerung der PP1-Aktivität könnte zu diesem Phänotyp beitragen. Eine weitere Rolle könnte jedoch auch der vorher beobachtete  $\beta_2$ AR abhängige protektive Phänotyp spielen. Die Rezeptorsubtypen unterliegen einer ungleichen Verteilung im Kardiomyozyten, sodass der  $\beta_2$ AR in den t-Tubuli in unmittelbarer Nähe zum LTCC, dem SR und damit auch in unmittelbarer Nähe zum RyR2 lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu zeigt der  $\beta_1$ AR eine gleichmäßige Verteilung auf der Kardiomyozytenoberfläche (Brette und Orchard, 2003). Da der  $\beta_2$ AR im Gegensatz zum  $\beta_1$ AR auch in der Lage ist an inhibitorische G-Proteine zu koppeln kann seine Aktivierung in diesem örtlichen Verband den

aktivierenden und möglicherweise schlechten Auswirkungen der  $G\alpha_s$  des  $\beta_1AR$  entgegen wirken (R. P. Xiao et al., 1995; Daaka et al., 1997; Nikolaev et al., 2010).

### 3.9 Untersuchung einer AAV-vermittelten Gentherapie zur Erhöhung der RKIP-Expression in der Herzinsuffizienzentwicklung

Die beiden bereits verwendeten Modelle der Isoprenalininfusion und der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) zeigten, dass die gesteigert RKIP-Expression in den RKIP-tg Tieren die Kontraktilität dauerhaft erhöhen kann ohne das Herz zu schädigen und zusätzlich der Entwicklung der Herzinsuffizienz im Hinblick auf den Grad und der Fibrosierung entgegenwirken kann. Diese Effekte sollten nun in einem Gentherapie-Versuch im TAC-Modell näher betrachtet werden. Durch die Injektion eines Vektors des Adenoassoziierten Virus des Serotyp 9 (AAV9) sollten ein RKIP- und eGFP-Konstrukt für eine gesteigerte Expression der Proteine sorgen (Inagaki et al., 2006). Durch den MLC-Promotor und, die dem Serotyp 9 eigene Präferenz Kardiomyozyten zu infizieren, sollte eine herzspezifische Expression gewährleistet werden (Pacak et al., 2006). Dadurch konnte der Effekt einer induzierbaren und vorübergehenden Überexpression untersucht werden. Die Expression des Vektors ist durch keinen langfristigen Einbau in das Genom und den Abbau des Vektors, von einer nicht dauerhaften Natur (Miyagi et al., 2008; Zincaelli et al., 2008) Für diesen Versuch wurden zunächst Wt im C57BL/6J Hintergrund gewählt.



**Abbildung 3.30:** Analyse der RKIP-Expression. Repräsentativer *Western Blot* aus  $n=4$  von 2D-Gelelektrophoresen des Bereichs  $< 35\text{kDa}$  (oben; Antikörper: RKIP, nach Lorenz et al., 2003) und Coomassie-Färbung des Bereichs  $> 50\text{kDa}$  zur Ladekontrolle (unten) von Herzlysaten aus Wt und RKIP<sup>KO</sup> Tieren.

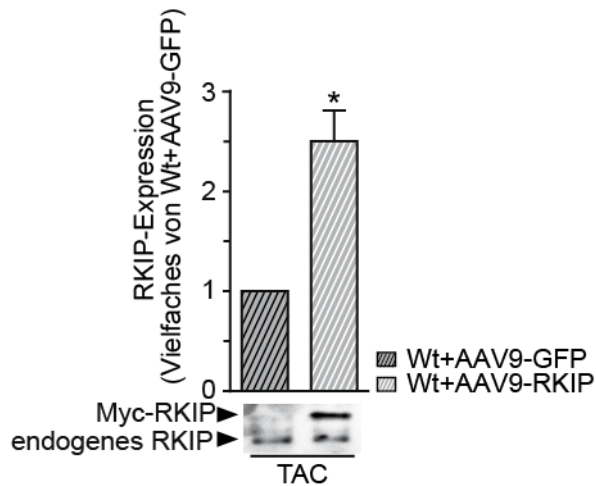


Von Interesse war in diesem induzierbaren Modell auch die Möglichkeit einen Verlust der endogenen RKIP-Expression auszugleichen. Um dies zu untersuchen wurde ein homozygoter RKIP<sup>KO</sup> generiert. Der *Knockout* wurde durch einen *Gene-Trap* Vektor erreicht (Mutant Regional Resource Center, MMRRC, Universität von Kalifornien, Davis), der eine *Splice*-Akzeptor-Sequenz enthält, durch die das RKIP-Gen nicht vollständig transkribiert wird, sondern eine Fusions-mRNA aus dem Anfang des RKIP und der im Vektor enthaltenden  $\beta$ -Galaktosidase/neo Fusion Gen ( $\beta$ -geo)-Kassette gebildet wird. Der Vektor liegt im Intron zwischen Exon 3 und 4. Die Deletion auf DNA und auf mRNA-Ebene wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Kristina Lorenz nachgewiesen. Die RKIP-KO Mäuse wurden mit C57BL/6J Wt verglichen.

Abbildung 3.30 zeigt eine Genotypisierung mittels 2D-Gelelektrophorese. Dies war nötig, da es durch unspezifische Banden im *Western Blot* von RKIP<sup>KO</sup> zu unspezifischen Banden kam (siehe *Western-Blot* in Schmid et al., 2015). Dies führte zu der Vermutung, dass es Isoformen des RKIP (PEBP2-5) gibt, auf die der verwendete Antikörper gegen RKIP reagiert. Um diese Isoformen von der Analyse auszuschließen wurde die 2D-Gelelektrophorese gewählt. Die Isoformen besitzen durch veränderte Aminosäuresequenzen einen unterschiedlichen isoelektrischen Punkt (pH an dem das Protein ungeladen vorliegt), durch den sie in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese unterschieden werden können. Gleichzeitig beeinflussen auch Modifikationen wie Phosphorylierungen den isoelektrischen Punkt. Der Bereich des pH-Gradienten wurde so gewählt, dass RKIP sowohl in seiner phosphorylierten wie auch unphosphorylierten Form im pH-Bereich liegt. So konnte neben dem Vorhandensein von RKIP auch der Phosphorylierungsstatus überprüft werden. Um die gleichmäßige Beladung und Auftrennung zu überprüfen wurden Coomassie-Färbungen der Bereiche über 50kD angefertigt.

Die im Wildtypen sichtbaren RKIP-Signale, die die unphosphorylierte und phosphorylierte Form des RKIP darstellen sind im RKIP<sup>KO</sup> nicht zu sehen. So konnte das Fehlen des RKIP im RKIP<sup>KO</sup> bestätigt werden. Für die Gentherapieversuche wurden Wt und RKIP<sup>KO</sup> im Moment der TAC-Operation mit dem Virus infiziert und nach vierwöchiger Aortenkonstriktion untersucht.

Um zu überprüfen, ob das AAV9-Konstrukt zu einer ausreichenden Überexpression führt musste diese untersucht werden. Dafür wurden Herzlysate nach vierwöchiger Expression und Aortenkonstriktion im Vergleich zu den AAV9-eGFP infizierten Tieren analysiert. Abbildung 3.31 zeigt, dass es durch die Injektion des AAV9-Virus zu einer gesteigerten Expression des Myc-RKIP kommt. Diese Expression entspricht dem 2,3-fachen des endogenen RKIP in den AAV9-eGFP behandelten Tiere.



**Abbildung 3.31:** Analyse der RKIP-Expression. Repräsentativer *Western Blot* (Antikörper: RKIP, nach Lorenz et al., 2003) und Quantifizierung von Herzlysaten aus Wildtyp Tieren (Wt) behandelt mit AAV9-Konstrukten, die für eGFP (AAV9-eGFP) oder RKIP (AAV9-RKIP) kodieren nach vierwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Angegeben ist der Mittelwert aus  $n=4$ , dabei wurde der Wt+AAV9-eGFP auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber Wt+AAV9-RKIP;  $p < 0,05$ .

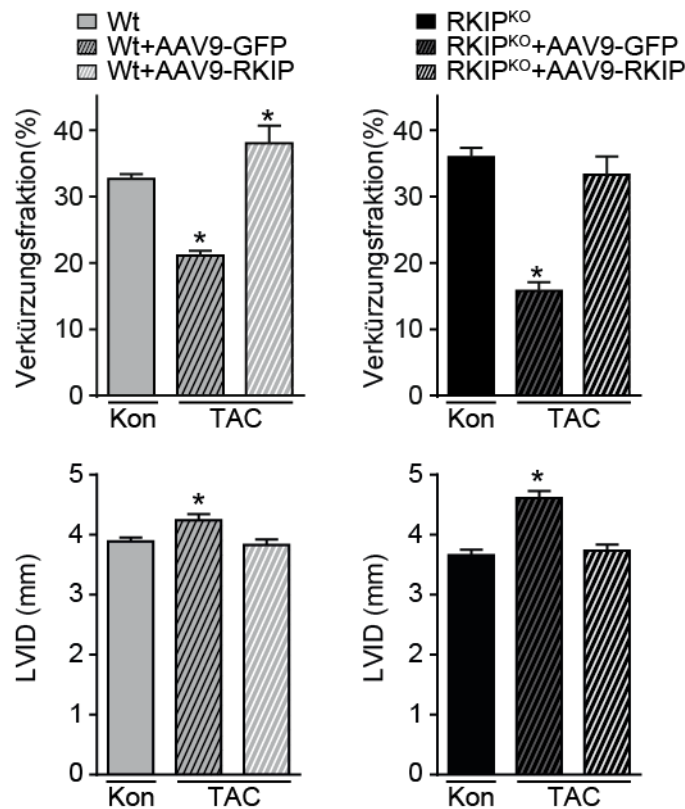
### 3.9.1 Untersuchungen der funktionellen Veränderungen in der Herzinsuffizienzentwicklung durch die Gentherapie

Ein Kennzeichen der Herzinsuffizienz ist der Verlust der Kontraktionsfähigkeit des Herzens. Das Herz ist nicht mehr fähig mit seiner Pumpleistung dem Bedarf des Körpers gerecht zu werden. Wie schon in Kapitel 3.3 wurden die funktionellen Parameter mittels echokardiografischer Untersuchungen bestimmt.

In Abbildung 3.32 (oben) ist die Verkürzungsfraktion als Maß der Kontraktilität dargestellt. Man sieht, dass es im Wt (links) sowie im  $\text{RKIP}^{\text{KO}}$  (rechts) bei Behandlung mit AAV9-eGFP nach TAC zu einer starken Reduktion der Verkürzungsfraktionen kommt. Diese ist im  $\text{RKIP}^{\text{KO}}$  noch stärker ausgeprägt als im Wt. Bei Behandlung mit dem AAV9-RKIP-Konstrukt wird der TAC-induzierte Kontraktilitätsverlust verhindert. Im Gegensatz zu den Wt Kontrolltieren ist die Verkürzungsfraktion erhöht, sodass die AAV9-RKIP Tiere sogar eine Steigerung ihrer Kontraktionsfähigkeit erfahren. Den  $\text{RKIP}^{\text{KO}}$  bleibt die Kontraktionsfähigkeit durch die Wiederherstellung der RKIP-Expression erhalten.

Im Hinblick auf die Dilatation (3.32, unten) des linken Ventrikels zeigt sich ein ähnliches Bild: Die AAV9-eGFP behandelten Tiere (Wt und  $\text{RKIP}^{\text{KO}}$ ) zeigen eine deutliche Erhöhung des Innendurchmessers, während die AAV9-RKIP-Tiere auf einem, dem jeweiligen Kontrolltieren angepassten Niveau, verbleiben. Auch bei diesem Parameter zeigen die  $\text{RKIP}^{\text{KO}}$ -AAV9-eGFP-Tiere eine verstärkt dilatiertere Ventrikel als Wt-AAV9-eGFP

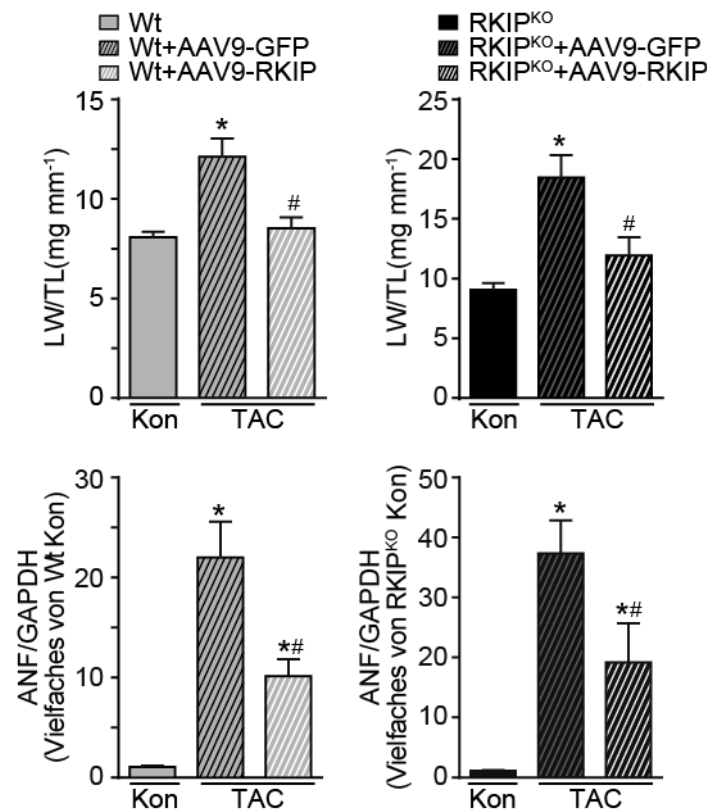
Tiere.



**Abbildung 3.32:** Effekte der Gentherapie auf die Herzfunktion. Echokardiografische Analyse der Verkürzungsfraction (oben) und des linksventrikulären Innendurchmessers (LVID, unten) von Wt (links) und RKIP<sup>KO</sup> (rechts) behandelt mit AAV9-eGFP oder AAV9-RKIP vor (Kon) und nach vierwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Angegeben ist der Mittelwert aus Wt n=22, Wt+AAV9-eGFP n=11, Wt+AAV9-RKIP n=11 und RKIP<sup>KO</sup> n=19, RKIP<sup>KO</sup>+AAV9-eGFP n=9, RKIP<sup>KO</sup>+AAV9-RKIP n=10. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Bedingungen; p < 0,05.

### 3.9.2 Einfluss des RKIP auf das Lungengewicht und die ANF-Expression als Parameter für das Ausmaß der Herzinsuffizienz

Als weitere Marker für den Grad der Herzinsuffizienz wurden das Lungengewicht im Verhältnis zur Tibiallänge und die Expression der mRNA des Herzinsuffizienzmarkers ANF analysiert. Im Verlauf einer linksventrikulären Herzinsuffizienz kommt durch den Rückstau des Blutes in den Lungenkreislauf zur Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge. Es bilden sich Ödeme, die die Aufnahme von Sauerstoff erschweren. Die Messung des Lungengewichts gibt daher auch einen Aufschluss über den Grad der Herzinsuffizienz (Interiano et al., 1973).



**Abbildung 3.33:** Effekte der Gentherapie auf den Herzinsuffizienzgrad. Analyse des Lungengewichts in Verhältnis zur Tibiallänge (oben; Mittelwert aus Wt n=14, Wt+AAV9-eGFP n=12, Wt+AAV9-RKIP n=12 und RKIP<sup>KO</sup> n=13, RKIP<sup>KO</sup>+AAV9-eGFP n=10, RKIP<sup>KO</sup>+AAV9-RKIP n=11) und der ANF-Expression mittels rtPCR (unten; Mittelwert aus n=9, Wt Kon bzw. RKIP<sup>KO</sup> Kon wurden dabei auf 1 gesetzt) von Wt (links) und RKIP<sup>KO</sup> (rechts) behandelt mit AAV9-eGFP oder AAV9-RKIP vor (Kon) und nach vierwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber den mit AAV9-eGFP-behandelten Tieren; p < 0,05.

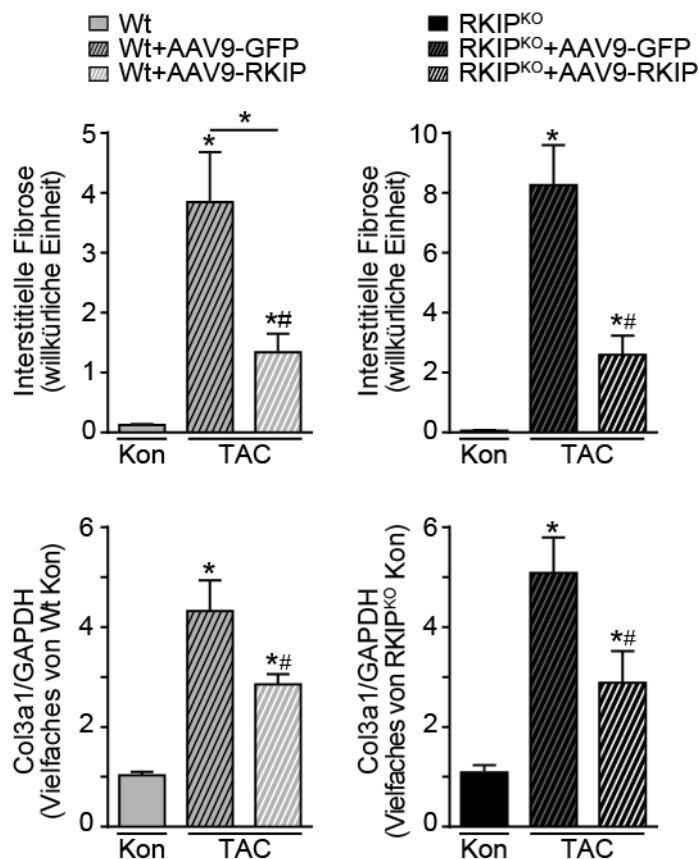
Ähnlich, wie das vorher untersuchte BNP, stellt auch ANF einen Marker für das Ausmaß der Herzinsuffizienz dar. Je höher die Expression dieses Faktors ist, desto gravierender ist die Herzinsuffizienz (Molkentin et al., 1998; Kehat und Molkentin, 2010).

In Abbildung 3.33 (oben) sieht man, dass es in den AAV9-eGFP behandelten Tieren im Wt (links) sowie im RKIP<sup>KO</sup> (rechts) zu einer Steigerung des Lungengewichts nach TAC kommt. Auch hier zeigt der RKIP<sup>KO</sup> eine weitaus größere Steigerung im Gegensatz zum Wt. In den AAV9-RKIP behandelten Tieren bleibt das Lungengewicht in beiden Genotypen fast unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Hinblick auf die Level der ANF-mRNA (unten) zeigen sich auch hier Ähnlichkeiten. Nach vierwöchiger Aortenkonstriktion nimmt diese in beiden Genotypen und durch beide Behandlungen

zu. Die AAV9-RKIP-Injektion kann jedoch das Ausmaß dieser Zunahme inhibieren.

### 3.9.3 Einfluss von RKIP auf die Entwicklung der interstitiellen Fibrose und der KollagenIII $\alpha$ 1-Expression

Die Ausbildung der interstitiellen Fibrose wurde wie schon in Kapitel 3.5 durch die Analyse der Sirius Rot Färbung und die Untersuchung der KollagenIII $\alpha$ 1-mRNA Level analysiert.



**Abbildung 3.34:** Effekte der Gentherapie auf die interstitielle Fibrose. Analyse der interstitiellen Fibrose durch Sirius-Rot-Färbung (oben; Mittelwert aus  $n=10$ ) und KollagenIII $\alpha$ 1-Expression mittels rtPCR (unten; Mittelwert aus  $n=9$ , Wt Kon bzw. RKIP<sup>KO</sup> Kon wurden dabei auf 1 gesetzt) von Wt (links) und RKIP<sup>KO</sup> (rechts) behandelt mit AAV9-eGFP oder AAV9-RKIP unter vor (Kon) und nach vierwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber den mit AAV9-eGFP-behandelten Tieren;  $p < 0,05$ .

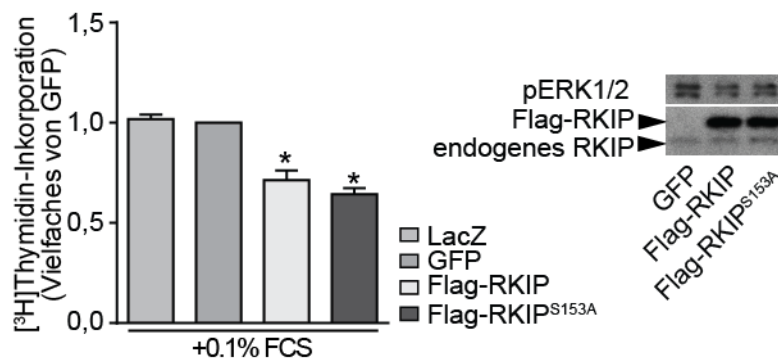
Abbildung 3.34 (oben) zeigt die histologische Auswertung der Sirius-Rot-Färbung von Paraffinschnitten. Die Aortenkonstriktion löst bei den Tieren (Wt, links und RKIP<sup>KO</sup>,

rechts), die mit dem AAV9-eGFP behandelt wurden eine starke Entwicklung einer interstitiellen Fibrose aus. Diese wird durch die AAV9-RKIP-Injektion verhindert. In Abbildung 3.34 (unten) zeigt sich ferner, dass mit der interstitiellen Fibrose auch KollagenIII $\alpha$ 1 Expression bei den AAV9-eGFP Tieren steigt. Die Erhöhung der RKIP-Expression durch die AAV9-RKIP-Injektion während der Herzinsuffizienzentwicklung kann diese Erhöhung verringern.

In den Gentherapie-Versuchen zeigt sich, dass auch eine spätere Steigerung der RKIP-Expression die gleichen Effekte wie die lebenslange Erhöhung der RKIP-Expression in den RKIP-tg Tieren verursacht. Zusätzlich kann man sehen, dass das Fehlen von RKIP die Anzeichen der Herzinsuffizienz im Hinblick auf Funktionalität, Schwere und Fibrosierung verschlimmert. Dies ist ein Indiz für eine protektive Wirkung des endogenen RKIP im Herzen. Ferner zeigt der Versuch in den RKIP<sup>KO</sup> Tieren, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Erhöhung der RKIP-Expression ausreicht, um den Phänotyp zu induzieren.

### 3.10 Einfluss des RKIP auf die Proliferation von Fibroblasten

Die Steigerung der Expression von RKIP hat einen antifibrotischen Phänotyp verursacht. Die Gentherapie in den RKIP<sup>KO</sup>-Tieren hat zusätzlich gezeigt, dass die Erhöhung der RKIP-Expression in Kardiomyozyten für diesen Phänotyp ausreicht. Um trotzdem Aussagen über die Effekte von RKIP in neonatalen Fibroblasten treffen zu können, sollten *in vitro* Proliferationsversuche helfen. Dazu wurden neonatale Fibroblasten mit verschiedenen Viren transduziert und der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen analysiert.

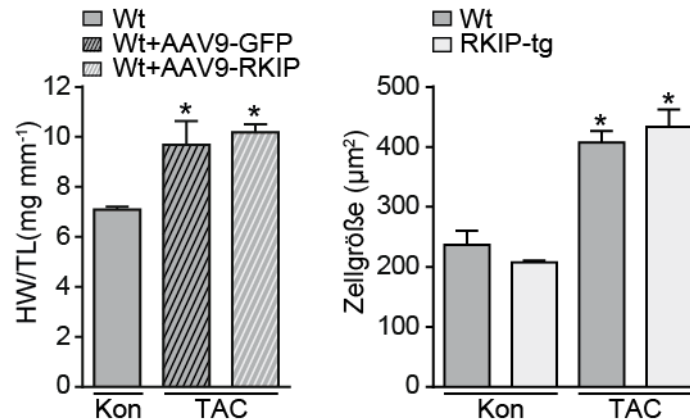


**Abbildung 3.35:** Untersuchung der Effekte von RKIP in Fibroblasten. Analyse der Proliferation von neonatalen Fibroblasten mittels Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin (<sup>3</sup>H-Thymidin) über einen Zeitraum von 96h. Untersucht wurden die verschiedenen Genotypen durch adenovirale Transduktion mit LacZ, eGFP, RKIP und RKIP<sup>S153A</sup> (links). Aufgetragen ist der Mittelwert aus n=12, außer LacZ n=3. Die eGFP-transduzierte Kontrolle ist auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber eGFP und LacZ; p < 0,05. Repräsentative *Western Blot* Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung (TEY, Antikörper: pERK1/2 (T202/Y204)) unter Transduktion von eGFP, RKIP und RKIP<sup>S153A</sup> (rechts).

Der Thymidineinbau in Abbildung 3.35 (links) zeigt die Proliferation der neonatalen Fibroblasten nach Transduktion mit zwei Kontrollviren (LacZ und eGFP), RKIP und der RKIP<sup>S153A</sup> Mutante. Man sieht, dass die Transduktion beider Kontrollviren einen ähnlichen Einfluss auf die Proliferation hat. Die RKIP und auch die RKIP<sup>S153A</sup> Transduktion führt zu einer Inhibition der Proliferation, wobei diese Inhibition bei der RKIP<sup>S153A</sup> stärker ist. Ferner zeigt die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung 3.35 (rechts), dass die RKIP-Expression unabhängig von der PKC-Phosphorylierung an Serin 153 zu einer Inhibition der ERK-Phosphorylierung führt. Dies zeigt, dass auch Wt, RKIP in den Fibroblasten, im Gegensatz zu den Kardiomyozyten eher im Raf-inhibitorischen Zustand vorliegt.

### 3.11 Einfluss des RKIP auf die Art des Herzwachstums

In der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielt auch die Hypertrophie des Herzens eine besondere Rolle. Dieses Herzwachstum wird als pathologische Hypertrophie bezeichnet und gilt neben der Entwicklung von interstitieller Fibrose und dem Sterben der Kardiomyozyten als ursächlich bei der Herzinsuffizienz (Kehat und Molкетин, 2010; Tham et al., 2015). Durch die Auswertung des Herzgewichtes und der Fläche der Kardiomyozyten im Querschnitt kann das Ausmaß der Hypertrophie bewertet werden.



**Abbildung 3.36:** Effekte der RKIP Expression auf das Entstehen einer Hypertrophie des Herzens. Analyse des Herzgewichtes im Verhältnis zur Tibialänge in mg/mm von Wt Tieren behandelt mit AAV9-eGFP oder AAV9-RKIP unter basalen Bedingungen (Kon) und nach vierwöchiger Aortenkonstriktion (TAC; links; Mittelwerte aus Wt n=14, Wt+AAV9-eGFP n=12, Wt+AAV9-RKIP n=12) sowie der Zellgröße von Wt und RKIP-tg Tieren in µm<sup>2</sup> unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC; rechts; Mittelwerte aus n=5). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); p < 0,05.

In Abbildung 3.36 (rechts) ist die Auswertung des Herzgewichtes nach Behandlung mit den AAV9-Konstrukten gezeigt. Durch die Induktion der Herzinsuffizienz mittels der Aortenkonstriktion steigt das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge an. Dies geschieht sowohl unter der Behandlung mit AAV9-eGFP sowie mit AAV9-RKIP. Auch in den transgenen Tieren zeigt sich trotz der zuvor gezeigten besseren Herzfunktion und des geringeren Herzinsuffizienzgrads kein Unterschied in der Fläche der Kardiomyozyten vor oder nach der Aortenkonstriktion. Die Erhöhung der RKIP-Expression nimmt demnach keinen Einfluss auf das Ausmaß des Wachstums des Herzens.

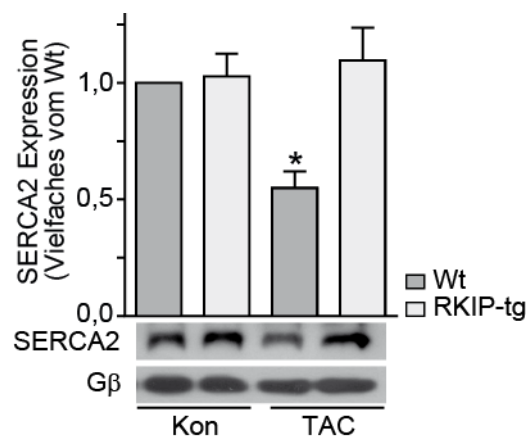
Die zuvor erhaltenen Ergebnisse in den Herzinsuffizienzmodellen ob in transgenen Tieren oder mittels Gentherapie zeigten eine protektive Wirkung in der Herzinsuffizienzentwicklung. Bedingt durch die vorigen Ergebnisse sollten die Entstehung der Hypertrophie näher hinterfragt werden. Neben der irreversiblen pathologischen Hypertrophie kann das



Herz auch in Folge von sportlicher Betätigung und einer Schwangerschaft wachsen. Diese Art der Hypertrophie ist reversibel und wird als physiologisch bezeichnet. Um zu untersuchen, um welchen Hypertrophietyp es sich im Falle der gesteigerten RKIP-Expression handelt, wurden einige Marker, die für eine physiologische Hypertrophie sprechen untersucht.

### 3.11.1 Einfluss des RKIP auf die SERCA2-Expression als Marker für physiologische Hypertrophie im TAC-Modell

Die schon in Kapitel 3.2 untersuchte Expression der SERCA2 ist ein Marker, der zur Unterscheidung herangezogen werden kann (Weeks und McMullen, 2011; Maillet et al., 2013). Während der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie kommt es zu einer Verringerung der Expressionsniveaus der SERCA2. Die Untersuchung dieses Markerproteins erfolgte mittels *Western Blot* Analyse.

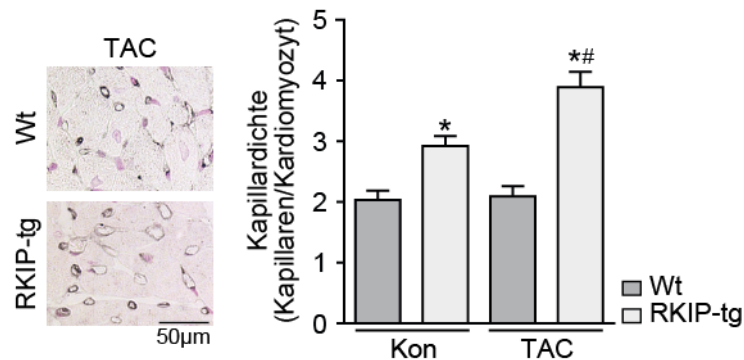


**Abbildung 3.37:** Analyse der Expression der SERCA2. Repräsentative *Western Blots* und entsprechende Quantifizierungen der SERCA2 Expression in Lysaten von Wt, RKIP-tg unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert aus  $n=8$ . Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber allen anderen Bedingungen;  $p < 0,05$ . In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz.

In Abbildung 3.37 sieht man im Wt eine niedrigere SERCA2-Expression nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion. In den RKIP-tg bleibt diese Expression auf dem Level der basalen Bedingungen bestehen. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine nicht pathologische und von der des Wt unterschiedliche Art der Hypertrophie.

### 3.11.2 Einfluss des RKIP auf die Kapillardichte im Myokard

Ferner sollte die Untersuchung der Kapillardichte im Herzen weiteren Aufschluss geben. Durch die höhere Leistung der Kardiomyozyten auf Grund der gesteigerten Anforderungen durch die Nachlast-Erhöhung bei der Aortenkonstriktion und den gesteigerten Sauerstoffbedarf bei sportlicher Betätigung müssen die Kardiomyozyten wachsen. Damit sie weiterhin mit Sauerstoff versorgt werden können, muss sich auch das Gefäßsystem den neuen Bedingungen anpassen (Burchfield et al., 2013). Dies geschieht bei der physiologischen Hypertrophie durch gleichzeitige Erhöhung der Kapillardichte im Myokard. In der pathologischen Hypertrophie bleibt diese Anpassung aus und kann somit ein Grund für die Apoptose einiger Zellen aus Unterversorgung sein (Kehat und Molkenkin, 2010; Maillet et al., 2013). Um die Kapillardichte zu untersuchen wurde ein Endothel-spezifischer Antikörper gewählt und durch immunhistologische Färbung das Kapillar-zu-Kardiomyozyt-Verhältnis analysiert.



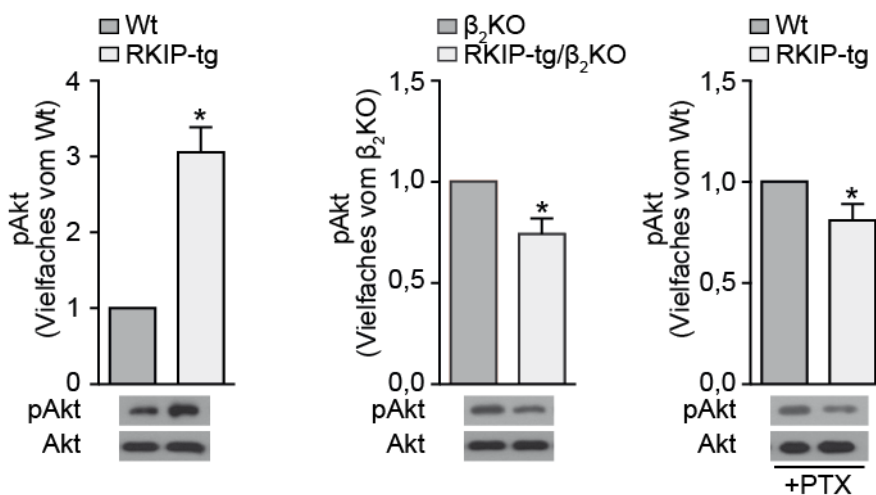
**Abbildung 3.38:** Untersuchung der Effekte von RKIP auf die Kapillardichte. Analyse und repräsentative Bilder der Kapillardichte im Verhältnis zur Anzahl der Kardiomyozyten mittels einer Endothelfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen CD31 in histologischen Parafinschnitten. Verglichen werden die Schnitte von Wt und RKIP-tg unter basalen Bedingungen (Kon) und nach dreiwöchiger Aortenkonstriktion (TAC). Aufgetragen ist der Mittelwert aus Wt Kon n=10, RKIP-tg Kon n=14, Wt TAC n=9, RKIP-tg TAC n=14. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber Wt; # signifikant gegenüber RKIP-tg Kon;  $p < 0,05$ . Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Karina Lamprecht und der Arbeitsgruppe unter Süleyman Ergün erzeugt.

Abbildung 3.38 zeigt repräsentative Bilder und die Auswertung der Schnitte. Es wird deutlich, dass die RKIP-tg ein höheres Verhältnis von Kapillaren zu Kardiomyozyten besitzen. Dies besteht unter basalen Bedingungen sowie nach der Induktion der Herzinsuffizienz. Ferner wird die Anzahl der Kapillaren pro Kardiomyozyt in den RKIP-tg Tieren nach TAC noch gesteigert, während sie bei den Wt auf basalem Niveau bleibt. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine bessere Blutversorgung in den Herzen der RKIP-tg

Mäuse gewährleistet wird als in den Wildtyp Herzen und stellt einen weiteren Unterschied im Herzwachstum da, der auf eine physiologische Hypertrophie hinweist.

### 3.11.3 Einfluss des RKIP auf die Akt-Aktivierung in Abhängigkeit des $\beta_2$ AR

Ein weiterer molekularer Marker für eine physiologische Hypertrophie ist die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Weeks und McMullen, 2011; Maillet et al., 2013). Dieser Signalweg kann unter anderem von den  $G\beta\gamma$  der  $G\alpha_i$ -gekoppelten  $\beta_2$ AR aktiviert werden (Stephens et al., 1994). Die Aktivierung der Akt wird zusätzlich auch mit einer antiapoptotischen Wirkung assoziiert. Dieser kann auch zur Ausbildung einer physiologischen Hypertrophie beitragen und auch den  $\beta_2$ AR abhängigen Phänotyp begründen. Aus diesem Grund sollte die Aktivierung in den Wt und RKIP-tg, sowie in den  $\beta_2$ KO und RKIP/ $\beta_2$ KO und unter Einfluss des  $G\alpha_i$ -Inhibitors *Pertussis Toxin* (PTX) untersucht werden.



**Abbildung 3.39:** Untersuchung der Akt-Aktivierung. Repräsentative *Western Blots* und entsprechende Quantifizierungen der Akt-Phosphorylierung an Threonin 308 (Antikörper: pAkt (T308)) in Lysaten von Wt und RKIP-tg unter basalen Bedingungen (links) und nach Behandlung der Tiere mit *Pertussis Toxin* (rechts) und von  $\beta_2$ KO und RKIP-tg/ $\beta_2$ KO (Mitte). Aufgetragen ist der Mittelwert aus n=6, dabei ist der Wt,  $\beta_2$ KO bzw. Wt PTX auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. \* signifikant gegenüber Wt,  $\beta_2$ AR bzw. Wt PTX; p < 0,05. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kristina Lorenz.

Abbildung 3.39 zeigt eine Erhöhung der Akt-Phosphorylierung in den RKIP-tg gegenüber dem Wt (links). Im Gegensatz dazu wirkt die Erhöhung der RKIP-Expression in den  $\beta_2$ AR-defizienten Mäusen zu einer Verringerung der Akt-Phosphorylierung (Mitte).

Auch die Inhibition des  $G\alpha_i$  mit PTX führt zu einer geringeren Akt-Phosphorylierung (rechts). Dies zeigt, dass RKIP auch über die Aktivität der Akt erhöht und diese Erhöhung in Teilen von einem  $G\alpha_i$  gekoppelten  $\beta_2AR$  abhängig ist.

Die Versuche zeigen, dass die Aortenkonstriktion in den RKIP-tg eine vom Wildtypen unterschiedliche Hypertrophie verursacht. Die in diesem Kapitel untersuchten Marker legen ein physiologisches und kompensatorisches Herzwachstums nahe. Dieses wird auch durch die in den anderen Teilen untersuchten Marker unterstützt. Die Expression von BNP und ANF und auch die Ausbildung einer interstitiellen Fibrose sind Anzeichen für eine pathologische Hypertrophie. Das diese Marker sowohl in den RKIP-tg als auch in den AAV9-RKIP in geringerem Maße auftreten, ist ein weiteres Indiz für eine gutartige Hypertrophie des Herzens unter Einfluss des RKIP.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise und Regulation von RKIP sowie die Effekte von RKIP in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen gewonnen werden.

RKIP stellt sich im kardialen Umfeld als Inhibitor der GRK2 dar, der eine unterschiedliche Wirkungen auf verschiedenen Substrate der GRK2 hat. Diese Art der GRK2-Inhibition bewirkte eine Verstärkung von  $\beta$ -adrenergen Signalwegen, welche in einer höheren Aktivität der Kinasen PKA, CaMKII und Akt resultierte. Interessanterweise führte die Erhöhung der Kinaseaktivität nicht zur gleichmäßigen Erhöhung der Phosphorylierung ihrer Substrate, sondern wies ein besonderes Phosphorylierungsschema auf, das unter anderem vom  $\beta_2$ AR abhängig ist. Die Effekte dieses Phosphorylierungsschemas zeigten sich in einer positiven Inotropie, die vor allem in einer beschleunigten Relaxation und einer erhöhten Calciumbelastung des SR begründet ist. *In vivo* konnte durch die Anwendung von Herzinsuffizienz- und Arrhythmie-Modellen ein protektiver Phänotyp nachgewiesen werden, welcher wiederum eine Abhängigkeit vom  $\beta_2$ AR aufweist.

In den folgenden Abschnitten wird detaillierter auf die einzelnen Ebenen der RKIP-Effekte eingegangen. Zu Anfang soll die Regulation und die inhibitorische Funktion von RKIP besprochen werden. Danach wird auf die molekularen Effekte der RKIP-Überexpression auf die  $\beta$ -adrenergen Signalwege eingegangen. Die daraus resultierenden Phänotypen (pos. Inotropie und Protektion gegenüber Herzinsuffizienz und Arrhythmien) werden nachfolgend diskutiert. Abschließend werden die Erkenntnisse über die Wirkungsweise des RKIP mit derzeit bekannten Strategien in der Herzinsuffizienztherapie verglichen. Im letzten Abschnitt soll ein Ausblick auf bestehende Fragestellungen gegeben werden.

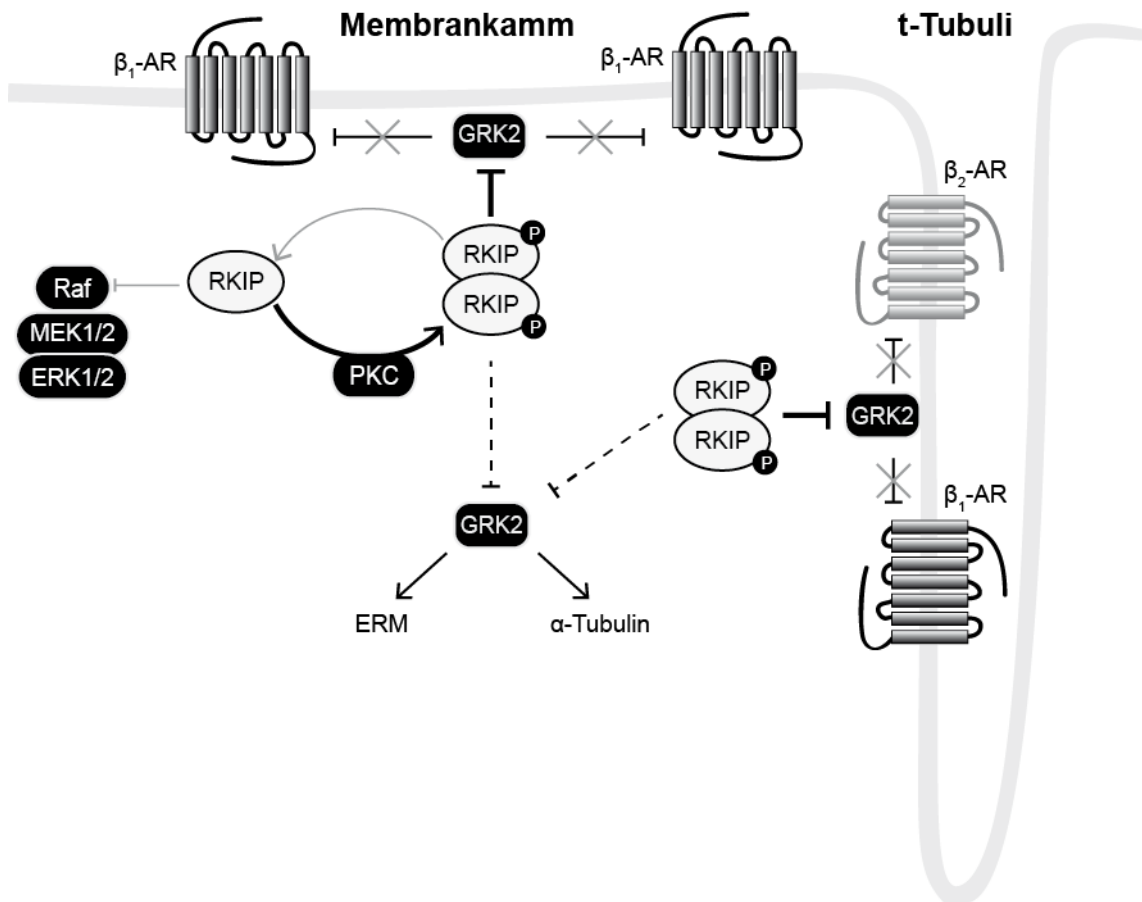
### 4.1 RKIP als Kinase-Inhibitor

Dass RKIP die Aktivität der GRK2 und der Raf/MEK/ERK-Kaskade inhibieren kann, wurde bereits in früheren Arbeiten (K. Yeung et al., 1999; Lorenz et al., 2003; Deiss et al., 2012) gezeigt und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit weiter bestätigt werden. Da die Inhibition von Phosphorylierungszustand an Serin 153 abhängig ist wurde RKIP auf

molekularer Ebene mittels 2D-Gelelektrophorese auf seinen Modifikationsstatus untersucht. Die 2D-Gelelektrophorese wurde vornehmlich für den Ausschluss von Isoformen benutzt, zeigt jedoch auch den Phosphorylierungsstatus des zu untersuchenden Proteins an. Durch diesen Versuch wurde sichtbar, dass endogenes RKIP in Wildtyp Mäusen vornehmlich in zwei Phosphorylierungszuständen vorliegt, wobei das Gleichgewicht stark auf die Seite einer phosphorylierten Form verschoben ist. Die Phosphorylierung an Serin 153 ist für die Dimerisierung und die nachfolgende Inhibition der GRK2 verantwortlich. Dadurch liegt RKIP im Herzen in einer Form vor, in der es präferentiell die GRK2 inhibiert. Dies steht im Einklang mit Vernetzungs-/*Cross-linking*- und Dephosphorylierungsversuchen aus früheren Arbeiten (Deiss et al., 2012). Unterstützt wird dieser Fund durch die Untersuchung der ERK1/2-Phosphorylierung (als Maß der Raf-Inhibition) in RKIP-tg Mäusen der dreifach und siebenfach überexprimierenden Linien (Abbildung 3.5). Hier zeigte sich, dass die Expression von RKIP keine (dreifach, Linie #4) oder nur eine geringe Hemmung (siebenfach #13) der ERK-Phosphorylierung und dadurch der Raf-Aktivität bewirkt. Dieser Versuch deutete an, dass das Gleichgewicht zwischen Raf- und GRK2-Inhibition auch von dem Level der RKIP-Expression abhängig ist. Eine Hypothese wäre, dass die basale PKC-Aktivität nur eine bestimmte Menge an RKIP phosphorylieren kann, sodass bei einer weiteren Steigerung der RKIP-Expression zunehmend unphosphoryliertes RKIP auf die Raf/MEK/ERK-Aktivität Einfluss nimmt (Lorenz et al., 2014). Durch dieses Phänomen könnten auch die gegensätzlichen Effekte anderer Veröffentlichungen erklärt werden. X. Fu et al., 2013 zeigte, dass eine Überexpression von RKIP die ERK1/2-Phosphorylierung inhibiert und dadurch eine sich spontan entwickelnde Herzinsuffizienz verursacht, die durch fehlende antiapoptotische Wirkungen des ERK1/2 bedingt ist. Eine stark erhöhte Expression von RKIP könnte solche Effekte haben. Als Indiz dafür dient die Inhibition der Raf/MEK/ERK-Kaskade durch die phosphorylierungsdefiziente Mutante (RKIP<sup>S153A</sup>), die nachgewiesenermaßen proapoptotische Effekte hat (Abbildung 3.5 und Schmid et al., 2015).

Ein zusätzlicher Indikator für die geringere Bedeutung der Raf-Inhibition im Kardiomyozyten kann auch in dem vergleichbaren Wachstum der Herzen (Hypertrophie) gesehen werden. Eine Raf-Inhibition würde zu einer verminderten Aktivierung von ERK1/2 führen und so die Entstehung einer Hypertrophie vermindern. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen dies jedoch nicht. Im Gegensatz dazu, scheint das Gleichgewicht in den untersuchten Fibroblasten auf der Seite der Raf/MEK/ERK-Kaskade zu liegen. Hier hat die Expression von Wildtyp und phosphorylierungsdefizientem RKIP eine ähnliche Wirkung, nämlich die Reduzierung der ERK-Aktivität und die dadurch vermittelte Pro-

liferation der Fibroblasten. Dies lässt den Schluss zu, dass die basale Aktivität der PKC in Fibroblasten nicht ausreicht, um zusätzliches RKIP zu phosphorylieren und dadurch scheint das Gleichgewicht letztendlich in Richtung Raf verschoben zu sein.



**Abbildung 4.1:** RKIP vermittelte Inhibition der GRK2 im Herzen. Das Gleichgewicht der RKIP-Wirkung zwischen Raf-Inhibition und GRK2-Inhibition hängt von der PKC-Phosphorylierung ab und liegt im Herzen auf der GRK2-Seite. Die GRK2-Inhibition wirkt sich auf die Rezeptorsubstrate aus ( $\beta$ AR), jedoch nicht auf die zytosolischen Substrate (ERM,  $\alpha$ -Tubulin, Schmid et al., 2015)

Durch die direkte Untersuchung der GRK2-Aktivität konnte neben der Regulation auch die Wirkungsweise der GRK2-Inhibition analysiert werden. Zunächst zeigte die reduzierte GRK2-vermittelte Phosphorylierung des  $\beta_2$ AR die inhibitorische Wirkung des RKIP auf die GRK2. Auf die Phosphorylierung des zytosolischen Substrats Ezrin hatte die Erhöhung der RKIP-Expression (Abbildung 3.6), im Gegensatz zum membranständige Rezeptorsubstrat ( $\beta_2$ AR), keinen Einfluss. Durch die RKIP-vermittelte Inhibition der GRK2 in Kardiomyozyten (Abbildung 4.1) wird die Frage aufgeworfen, wie es RKIP

möglich ist, die Phosphorylierung von Rezeptorsubstraten spezifisch zu inhibieren. Aus Deiss et al., 2012 ist bekannt, dass die Phosphorylierung zur Dimerisierung benötigt wird und RKIP nur als Dimer in der Lage ist die GRK2 zu binden. Ferner ist aus Lorenz et al., 2003 bekannt, dass RKIP vor allem an den N-Terminus der GRK2 bindet, welcher auch für die Bindung an GPCR verantwortlich ist (Huang und Tesmer, 2011). Dadurch könnte man eine kompetitive Hemmung vermuten, bei der RKIP die Interaktion der GRK2 mit den  $\beta$ AR verhindert, indem es die Interaktionsschnittstelle der GRK2 blockiert. Es wäre weiter denkbar, dass der N-Terminus der GRK2 nicht an der Interaktion/Phosphorylierung von zytosolischen Substraten beteiligt ist und dies die Substratspezifität erklärt. Eine strukturelle Charakterisierung der Interaktionsschnittstelle könnte diese Erkenntnisse bestätigen. Außerdem könnte sie bei der Entwicklung kleiner chemischer Inhibitoren behilflich sein, da es trotz einiger Versuche noch keinen niedermolekularen spezifischen GRK2-Inhibitor gibt.

Die hier durchgeführten Versuche sollten vor allem die Effekte auf die GRK2 und Raf differenziert betrachten, da sie als direkte Interaktionspartner identifiziert wurden, d.h. ihre Interaktion kommt ohne Hilfe von Stützproteinen, sogenannten *Scaffold*-Proteinen zustande (K. Yeung et al., 1999; Lorenz et al., 2003; Deiss et al., 2012). Neben diesen beiden Kinasen sind auch andere Kinasen (NIK, TAK, GSK3 $\beta$ ) bekannt, die mit RKIP interagieren (K. C. Yeung et al., 2001; Zeng et al., 2008). Es bleibt offen, ob die durch RKIP verursachten Phänotypen auch von diesen anderen Kinasen beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang besteht die Fragestellung nach den Proteinmodifikationen, *Scaffold*-Proteinen oder der Lokalisation, die die Bindung zu den anderen interagierenden Kinasen vermitteln. Der Modifikationsstatus könnte weitere Regulationsmechanismen bereitstellen und die Interaktionen mit anderen Kinasen detaillierter charakterisieren. In diesem Zusammenhang könnte auch das von Skinner und Rosner, 2014 vorgestellte Modell helfen. Der energetisch höhere Kinase-affine Zustand könnte als Basis für weitere Proteinmodifikationen dienen. Auch durch die Bindung von Liganden in der Bindungstasche können Konformationen stabilisiert werden, die RKIP zur Inhibition anderer Kinasen befähigen (Skinner und Rosner, 2014).

### 4.2 RKIP in $\beta$ -adrenergen Signalwegen

Die Untersuchung der RKIP Effekte auf die  $\beta$ -adrenergen Signalwege zeigte, dass RKIP in der Lage ist die Signaltransduktion, die den  $\beta$ AR/ $G\alpha_s$  nachgeschaltet ist, zu verstärken. Die untersuchten Parameter waren die cAMP-Akkumulation, die PKA-Aktivität



und das Calcium-*Cycling* in NRKM, sowie die PKA- und CaMKII-Aktivität und das Calcium-*Cycling* in transgenen Mäusen (Abbildungen 3.2, 3.3, 3.10, 3.11). Durch diese Versuche wird deutlich, dass RKIP  $\beta$ -adrenerge Signalwege verstärkt. Ein Unterschied zwischen den *in vitro* Versuchen in NRKM und den *in vivo* Versuchen in den transgenen Mäusen ist jedoch auffällig. So führte die RKIP-Expression nur in den transgenen Mäusen zu einer basalen Erhöhung der PKA-Aktivität und einer Beschleunigung des Calcium-*Cyclings*. In den NRKM hingegen sieht man die Unterschiede in der cAMP-Akkumulation und in der PKA-Aktivität erst nach Zugabe von Stimulanzen wie Isoprenalin, ein Agonist der  $\beta$ AR. Die Untersuchung des Calcium-*Cyclings* stellt einen Sonderfall dar. Hier bewirkt RKIP in transfizierten NRKM eine Beschleunigung des Calciumrücktransports. Ein Grund dafür könnte sein, dass die elektrischen Impulse (20V, 0,5Hz) ausreichen, um die Unterschiede zwischen LacZ- und RKIP-transduzierten Zellen sichtbar zu machen, d.h. eine ausreichende Stimulation auszuüben.

Eine Besonderheit ergab sich außerdem bei der Untersuchung der cAMP-Akkumulation. Die Radioimmunologische Untersuchung zeigte ein höheres Maximum, bei ähnlichen EC50-Werten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die RKIP-Expression zu niedrig ist, um Unterschiede in diesem Bereich sichtbar zu machen. Aus diesem Grund wurde die PKA-Aktivität in Abhängigkeit zu der RKIP-Expression (RKIP<sup>hoch</sup>, RKIP<sup>niedrig</sup>) mit einer Isoprenalinkonzentration im Bereich des EC50-Wertes untersucht (Abbildung 3.3). Es zeigte sich deutlich, dass abhängig vom Expressionsniveau die Isoprenalinkonzentration ausreicht, um eine Steigerung der PKA-Aktivität in den RKIP<sup>(hoch)</sup>-transduzierten Zellen gegenüber den mit der gleichen Virusmenge Kontroll-transduzierten Zellen herbeizuführen. Da in transgenen Mäusen bereits ein basaler Phänotyp besteht, kann man vermuten, dass ein ausreichendes Expressionslevel erreicht wurde und die basale Aktivierung der  $\beta$ AR ausreicht, damit die RKIP-Effekte sichtbar werden. Umgekehrt wird dieses Phänomen von der Tatsache unterstützt, dass auch die Deletion von RKIP *in vivo* keinen basalen kardialen Phänotyp zeigt.

Neben der Verstärkung der konventionellen Signalwege über die  $G\alpha_s$  Proteine konnte auch die Aktivierung weiterer Signalwege, die den  $\beta$ AR nachgeschaltet sind, gezeigt werden. Dazu gehören zum einen die  $G\alpha_i$ -Kopplung des  $\beta_2$ AR, sowie die  $G\alpha_s$ -unabhängigen Signalwege des  $\beta_1$ AR. Die Untersuchung der Akt-Phosphorylierung (Abbildung 3.39) konnte zeigen, dass es über eine  $\beta_2$ AR/ $G\alpha_i$  Kopplung zur PI3K/Akt-Aktivierung kommt. Da dieser Signalweg in Verbindung mit einer antiapoptotischen Wirkung steht (Matsui und Rosenzweig, 2005; Sussman et al., 2011), könnte dies zum Phänotyp in den RKIP-tg Mäusen beitragen.

Auch in früheren Ergebnissen von Lorenz et al., 2003 war eine  $\beta$ AR-abhängige RKIP-Phosphorylierung an Serin 153 zu beobachten. Diese wird durch die PKC vermittelt. Die Diskrepanz zwischen  $G\alpha_s$ -Kopplung und PKC-Aktivierung begründete die Fragestellung für meine Diplomarbeit (2011). Die weiterführende Untersuchung in NRKM wies auf eine dem  $\beta$ AR nachgeschaltete Epac-Rap2b-PLC-Aktivierung hin. Dephosphorylierungsversuche in Abhängigkeit zu den  $\beta$ AR-Subtypen zeigten zudem eine stärkere Beteiligung des  $\beta_1$ AR an der RKIP-Phosphorylierung. Zusammengefasst zeigt sich über diese Ergebnisse eine zusätzliche  $G\alpha_s$ -unabhängige Signaltransduktion des  $\beta_1$ AR unter Beteiligung von Epac.

Bislang steht fest, dass RKIP  $\beta$ -adrenerge Signalwege verstärkt, die über  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$  und Epac vermittelt werden. Eine daraus resultierende Fragestellung ist, ob alle den  $\beta$ AR nachgeschalteten Signalwege verstärkt werden, oder ob RKIP auch anderweitig Einfluss auf die Signalweiterleitung nimmt. Ein naheliegender Signalweg, der eine bedeutende Rolle in der heutigen Erforschung von „*biased*“ Signalwegen spielt, ist die Aktivierung des  $\beta$ -Arrestins. Die für die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung nötige Rezeptorphosphorylierung wird von RKIP verhindert. Auch die dem  $\beta$ -Arrestin nachgeschalteten Signalwege, wie z.B. die ERK1/2-Phosphorylierung (Cargnello und Roux, 2011) oder die CaMKII-Aktivierung (Mangmool et al., 2010), könnten somit gehemmt werden. Im Falle der ERK1/2 Phosphorylierung ist unklar, warum die Stimulation der  $\beta$ AR/ $G\alpha_s$  keine ERK1/2-Aktivierung (Vidal et al., 2012) nach sich zieht. In diesem Fall könnte die Inhibition von Raf durch RKIP oder auch eine mögliche Inhibition der  $\beta$ -Arrestin-vermittelten Aktivierung zum Tragen kommen. Im Fall der CaMKII würde eine Hemmung der  $\beta$ AR-Signalwege die Aktivierung verhindern, da diese von Epac und  $\beta$ -Arrestin abhängt (Grimm und Brown, 2010; Erickson, 2014). Da in den RKIP-tg Mäusen die CaMKII-Aktivität trotzdem erhöht ist, kann die CaMKII durch andere Mechanismen aktiviert werden. Eine Möglichkeit, die zu nennen wäre, ist die Aktivierung über einen erhöhten Calciumspiegel im Zytosol (Erickson, 2014).

Zusammenfassend kann man sagen, dass RKIP über die  $\beta$ AR Einfluss auf eine breite Signalvielfalt nehmen kann. Welche Signale letztlich in welcher Weise beeinflusst werden, um die ausgeglichenen Effekte der beobachteten Phänotypen zu verursachen, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

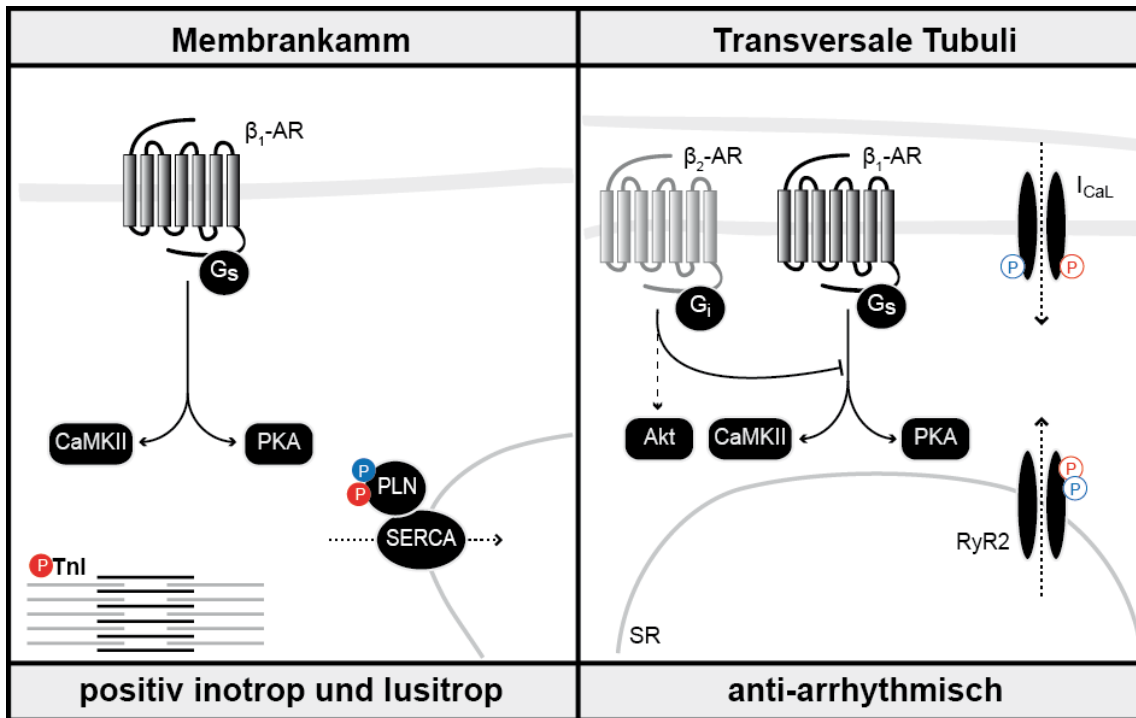
### 4.3 Die RKIP-vermittelten Phänotypen

Die bedeutendste Aufgabe der  $\beta$ AR ist die Steuerung der Kontraktilität. Da RKIP  $\beta$ -adrenerge Signale verstärkt, liegt ein Augenmerk auf der kardialen kontraktilen Funktion der RKIP-tg Mäuse. In dieser Arbeit konnte über mehrere Versuche und in verschiedenen Tier- und Zellmodellen ein positiv inotroper Effekt des RKIP bestätigt werden. Die Erhöhung der Expression führte zu einer gesteigerten Kontraktionsrate, sowie zu einem beschleunigten Rücktransport des Calciums in das SR der NRKM. *In vivo* konnte durch die Messung der Calciumtransienten ein erhöhter maximaler zytosolischer Calciumspiegel und damit eine erhöhte Kontraktionskraft, sowie eine höhere Calciumbeladung des SRs nachgewiesen werden. Durch echokardiografische Untersuchungen in FVB/N und C57BL/6J zeigte sich ferner eine durch RKIP erhöhte Verkürzungsfraction. Dieser Effekt konnte durch die Isoprenalininfusion weiter gesteigert werden. Ein positiv inotroper Effekt konnte zudem in den AAV9-RKIP behandelten Wt-Tieren beobachtet werden, in denen die Kontraktilität selbst nach vierwöchiger Aortenkonstriktion noch erhöht war. Interessanterweise zeichnete sich in der Untersuchung der  $\beta_1$ AR- und  $\beta_2$ AR-defizienten Mäuse ( $\beta_1$ KO,  $\beta_2$ KO) eine Abhängigkeit des Phänotyps vom  $\beta_1$ AR ab, da es im  $\beta_1$ KO Hintergrund zu keiner Erhöhung der Kontraktionskraft mehr kam. In Abbildung 4.2 ist dargestellt, wie RKIP die positiv inotropen und lusitropen Effekte über den  $\beta_1$ AR bewirken könnte. RKIP führt zur Erhöhung der Phosphorylierung von Troponin I und Phospholamban (Schmid et al., 2015). Dies sind zwei Proteine, die die Steigerung der Kontraktionskraft sowie die Beschleunigung der Relaxationszeit vermitteln. Die Wirkung der erhöhten SERCA2-Funktion, die durch die PLN-Phosphorylierung ausgelöst wird, zeigt sich auch in dem beschleunigten Rücktransport in das SR, sowie in dem erhöhten Calciumgehalt des SR. Anders als die Phosphorylierungen an TnI und PLN, tragen die  $\beta$ AR-stimulierten Angriffspunkte am RyR2 oder LTCC nicht zur Kontraktilitätssteigerung bei. Es hat sich außerdem gezeigt, dass RKIP Einfluss auf die Aktivität der Kinasen (PKA und CaMKII) nimmt, die die Calcium-translozierenden Proteine phosphorylieren. Die untersuchten Phosphorylierungen des LTCC und RyR2 waren im Fall des LTCC (Abbildung 3.29) unbeeinflusst und im Fall des RyR2 (Abbildung 3.28) verringert. Währenddessen bleiben die Expressionen von LTCC, RyR2, SERCA2 oder NCX unter basalen Bedingungen von RKIP unbeeinflusst (Abbildung 3.8, 3.9). Der Phosphorylierungsstatus von LTCC und RyR2 spielt eine große Rolle für die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Die Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten Phosphorylierungsstellen ist nicht abschließend geklärt und wird aktiv diskutiert (B. Xiao et al., 2005; Bers, 2006; Bers,

2012; Dobrev und Wehrens, 2014; Houser, 2014). Die Wahl der beiden Stellen ergab sich jedoch aus Ergebnissen (Wehrens et al., 2004; Carter et al., 2006; Wehrens et al., 2006), die für eine CaMKII-vermittelte (Ser2814) und eine PKA-vermittelte (Ser2808) Phosphorylierung sprachen, die beide die  $\beta$ -adrenerge Stimulation des RyR2 ausführen. Die Schlussfolgerungen müssen deshalb eher auf Basis der Ser2814-Phosphorylierung gezogen werden, da der Ser2808 eine Funktion in der  $\beta$ -adrenergen Aktivierung abgesprochen wurde (Dobrev und Wehrens, 2014; Houser, 2014). Für die getroffenen Aussagen ist dies letztlich aber von geringer Bedeutung, da unter RKIP beide Kinasen aktiv sind und die CaMKII ohnehin in größerem Maße mit maladaptiven Umbauprozessen assoziiert wird (Grueter et al., 2007). Es ist bestätigt, dass beide Kanäle arrhythmogenes Potential besitzen und dadurch kann das Ausbleiben dieser Phosphorylierungen als positiver Effekt angesehen werden.

Die Hyperaktivität der beiden Kanäle (LTCC und RyR2), die die Einleitung der Systole vermitteln, kann für gleichbleibende diastolische einwärtsgerichtete Ströme verantwortlich und damit eine Ursache für frühe und späte Nachpolarisationen sein (Dorn et al., 1999; Guo et al., 2006; Ling et al., 2009; Eschenhagen, 2010; Koval et al., 2010; Shan et al., 2010; Anderson et al., 2011; Respress et al., 2012; Shiferaw et al., 2012; Dobrev und Wehrens, 2014). Die Auswirkungen der verringerten Phosphorylierung zeigt sich in einer ebenso verringerten Neigung zum Auftreten von Extrasystolen in RKIP-tg Mäusen gegenüber den Wt Mäusen (Abbildung 3.26). Dass dieser Phänotyp von den Signalwegen des  $\beta_2$ AR abhängt, wurde im  $\beta_2$ KO sichtbar. Im Rahmen von Schmid et al., 2015 wurde die LTCC- und RyR2-Phosphorylierung auch im  $\beta_2$ KO und nach Hemmung von  $G\alpha_i$  durch PTX untersucht. In den Experimenten zeigte sich eine Steigerung der Phosphorylierung der Kanäle. Im Zusammenhang mit der telemetrischen Untersuchung dieser Mäuse, die eine erhöhte Neigung zu Extrasystolen zeigten (Abbildung 3.27), könnte man vermuten, dass die  $\beta$ AR/ $G\alpha_i$ -Kopplung die Hyperphosphorylierung der Kanäle verhindert, die durch die gesteigerten  $\beta_1$ AR Signale induziert werden.

Eine Ursache für dieses ungleichmäßige Phosphorylierungsschema könnten lokale Signale der  $\beta$ AR an den t-Tubuli sein (Kuschel et al., 1999; Orchard und Brette, 2008; Nikolaev et al., 2010). Durch die unmittelbare Nähe des LTCC in der Zellmembran und dem RyR2 in der SR-Membran, sowie dem gleichzeitigen Vorhandensein des  $\beta_1$ AR und  $\beta_2$ AR in der Zellmembran bildet sich eine Mikrodomäne, die durch spezielle Signalwege charakterisiert ist. Die  $\beta_2$ AR/ $G\alpha_i$ -Kopplung vermindert die  $\beta_1$ AR/ $G\alpha_s$ -vermittelte cAMP-Produktion. Dadurch wird die Kinaseaktivität und die Phosphorylierung an LTCC und RyR2 beeinflusst. Als Konsequenz verhindert RKIP eine irreguläre Calciumfreisetzung

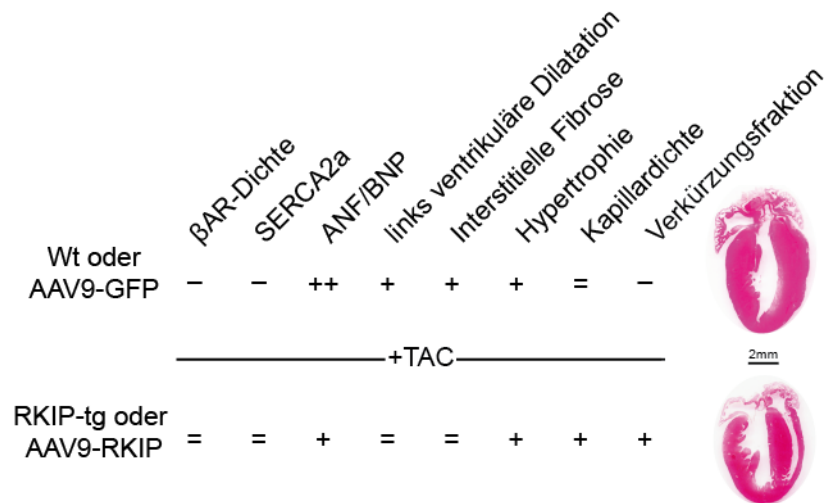


**Abbildung 4.2:** Dargestellt sind die unterschiedlichen Mikrodomänen am Membrankamm und an den Membranen der transversalen Tubuli. Positiv inotrope und lusitrope Effekte des RKIP werden über den  $\beta_1$ AR vermittelt. Das arrhythmogene Potential des  $\beta_1$ AR wird an den t-Tubuli durch den  $\beta_2$ AR aufgehoben. Rot-gezeichnete Phosphorylierungen stellen Angriffspunkte der PKA dar und blau-gezeichnete die der CaMKII. Gefüllte Phosphorylierungen zeigen eine verstärkte Phosphorylierung durch RKIP. Umrandete Phosphorylierungsstellen zeigen eine verringerte oder unveränderte Phosphorylierung. **I<sub>CaL</sub>** L-Typ-Calciumkanal; **RyR2** Ryanodin-Rezeptor 2; **CaMKII**  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Kinase II; **Akt** Akt/PKB; **SR** sarkoplasmatisches Retikulum **AC** Adenylylcyclase; **cAMP** zyklisches Adenosinmonophosphat; **PKA** cAMP abhängige Proteine Kinase A; **SERCA2** sarkoplasmatische Calcium-ATPase; **PLN** Phospholamban; **TnI** Troponin I.

und inhibiert somit auch die Einleitung von Apoptosemechanismen.

Neben der positiven Inotropie zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass sich die RKIP-Expression auch protektiv auswirkt. Dies wurde zunächst im Modell (Rona, 1985; Hohimer et al., 2005) der chronischen  $\beta$ -adrenergen Aktivierung sichtbar. Die Tiere wurden vor der Dilatation des Ventrikels und der Ausbildung einer interstitiellen Fibrose geschützt. In dem von Kathrin Kahlert durchgeführten Versuchen zeigten sich diese Effekte auch bei einer Erhöhung der Nachlast durch TAC (siehe auch Schmid et al., 2015). Zusätzlich wurden mit ANP und BNP und KollagenIII $\alpha$ 1 Marker untersucht, die charakteristisch für die Umbauprozesse des Herzens sind. Die Untersuchung der protektiven Effekte in den  $\beta$ KOs konnte zeigen, dass die Effekte von dem  $\beta_2$ AR abhängig sind. Durch die differenziertere Betrachtung des fibrotischen und hypertrophen

Phänotyps konnten die Wirkungen des RKIP detaillierter charakterisiert werden. Der Versuch der AAV9-vermittelten RKIP-Expression war sowohl im RKIP<sup>KO</sup>, in dem RKIP reexprimiert wurde und im Wildtyp, in dem RKIP als Therapeutikum verwendet wurde, erfolgreich. In Abbildung 4.3 sind die Effekte des RKIP aufgelistet. Im Einzelnen betrachtet führen bei RKIP wohl mehrere Mechanismen zur Ausbildung des protektiven Phänotyps.



**Abbildung 4.3:** Zusammenfassung der RKIP-vermittelten Effekte unter erhöhter Nachlast durch transversale Aortenkonstriktion (+TAC). (-) stellt eine Verringerung, (+) eine Erhöhung, (++) eine starke Erhöhung und (=) keine oder nur geringe Veränderungen. Rechts sind zwei mit HE-gefärbte Longitudinalanschnitte von Wt mit AAV9-eGFP und Wt mit AAV9-RKIP behandelten Herzen.

Eine Kombination der direkten Inhibition einzelner maladaptiver Effekte, sowie das Zusammenspiel der Signalwege, das die Nötigkeit der Induktion vorwegnimmt, scheinen diese RKIP-Wirkung zu verursachen. Einerseits werden frühe pathologische Mechanismen inhibiert: Es bleiben die Steigerung der GRK2-Expression, sowie die des  $\text{G}\alpha_i$  aus. Andererseits wird in RKIP-tg Mäusen die PKA- und CaMKII-Aktivität gesteigert, welche die Genexpression in Richtung fetaler Gene steuern können (Antos et al., 2001; T. Zhang et al., 2003; Anderson et al., 2011). Gleichzeitig wird durch die Akt eine kardioprotektive Kinase aktiviert, die den apoptotischen Signalwegen entgegensteht (Abbildung 3.39; Chesley et al., 2000; Talan et al., 2011). Besonders ist auch die  $\beta_2$ AR-Abhängigkeit dieser Mechanismen. Dies weist auf die schon erwähnten Effekte auf das Calcium-*Cycling* hin. Zusätzlich ist auch die Akt-Aktivierung von dem  $\beta_2$ AR abhängig und wird durch  $\text{G}\alpha_i$  verstärkt. Durch die AAV9-vermittelte Gentherapie in Wt-Mäusen konnte ferner

gezeigt werden, dass die RKIP-Effekte nicht auf einer Gewöhnung des Herzmuskels an die erhöhte Leistung beruhen, sondern auch durch die spontane Expression die gleichen Effekte erzielt werden können.

Vor allem für die Klassifizierung der Hypertrophie spielt das fetale Genprogramm eine Rolle (Maillet et al., 2013, siehe Abbildungen 3.19, 3.20, 3.23, 3.24, 3.33, 3.34). Die RKIP-tg Tiere zeigen ähnliche Ausprägungen der Hypertrophie (Abbildung 3.36), trotzdem entsprechen die Charakteristika weitestgehend einer physiologischen an Stelle einer pathologischen Hypertrophie. Die gleichbleibende Expression der SERCA2 (Abbildung 3.37) zeigt den Erhalt der Funktionalität des Herzmuskels und deutet auf eine reguläre Funktion der Mitochondrien hin. Zusätzlich kann durch die Steigerung der Kapillardichte (Abbildung 3.38) eine bessere Sauer- und Nährstoffversorgung erzielt werden, so dass es nicht aus Gründen der Mangelversorgung zum Absterben der Kardiomyozyten durch Apoptose oder Nekrose kommt.

Die Ausbildung der Fibrose ist eine besondere strukturelle Veränderung des Herzmuskels, die zur Versteifung und zum kontraktile Funktionsverlust beiträgt. Über die Modelle hinweg zeigten die RKIP-exprimierenden Tiere weniger interstitielle Fibrose und eine nur im geringem Maße beeinträchtigte Kontraktilität. Eine besondere Erkenntnis konnte durch die AAV9-vermittelte Reexpression des RKIP im RKIP<sup>KO</sup> gewonnen werden. Die Tatsache, dass die RKIP-Expression in Kardiomyozyten genügt, um die profibrotischen Signale zu unterbinden, spricht dafür, dass die RKIP-Expression die interzelluläre Kommunikation zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten und besonders den Austausch von pro- oder antifibrotischen Faktoren beeinflusst. Das ergänzende Experiment in Fibroblasten (Abbildung 3.35) konnte zeigen, dass RKIP in Fibroblasten anders reguliert wird und so die Fibroblastenproliferation negativ beeinflusst. Eine gleichzeitige Expression von RKIP in Kardiomyozyten und Fibroblasten könnte somit den Phänotyp verstärken.

Zusammengefasst bewirkt die RKIP-Expression eine Hypertrophie mit physiologischen Charakteristika, die die Kontraktilität eher unterstützt als beeinträchtigt. Gleichzeitig verhindert sie, durch gerichtete  $\beta$ -adrenerge Aktivierung und ausgeglichenes Calcium-*Cycling* die Induktion von maladaptiven Umbauprozessen und führt zusätzlich zur Aktivierung von protektiven Signalwegen.

## 4.4 RKIP als Therapeutikum

In der Herzinsuffizienztherapie ist die Steigerung der Kontraktilität eine kritische Komponente. Bei der Untersuchung von positiv inotropen Therapeutika (McMurray et al., 2012; Tacon et al., 2012) und Tiermodellen kam es oft zur Induktion von maladaptiven Umbauprozessen (Antos et al., 2001; T. Zhang et al., 2002; Sag et al., 2009). Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben waren therapeutische Angriffspunkte, die zu einer globalen Verstärkung von  $\beta$ -adrenergen Signalen führten, nicht von Erfolg geprägt. Der Angriff an den Rezeptoren führte gleichzeitig zur Desensitivierung dieser (Bristow et al., 1986; Bristow et al., 1989). Die  $\beta$ AR unabhängige Aktivierung der PKA oder CaMKII verstärkte auch die Phosphorylierung der maladaptiven Angriffspunkte, so resultiert daraus z.B. die Herabregulation der  $\beta_1$ AR mRNA (Bristow et al., 1993). Ähnliche Konsequenzen sind auch der Erhöhung des cAMP-Produktion durch PDE-Inhibition oder der PP1-Inhibition zuzuschreiben (El-Armouche et al., 2008; Wittköpper et al., 2011; McMurray et al., 2012). Allen Ansätzen ist gemeinsam, dass die Aktivität der  $\beta$ -adrenergen Signalwege gesteigert wird, sodass es zur Aktivierung und gleichermaßen auch zur negativen Rückkopplung kommt, wodurch mitunter auch maladaptive Prozesse gestartet werden. Wie schon in transgenen Mausmodellen gezeigt scheint der  $\beta_1$ AR dabei einen größeren Anteil an den kontraktilitätssteigernden Mechanismen zu haben (R. P. Xiao et al., 1994). Jedoch ist seine Aktivierung auch in höherem Maße mit der Aktivierung der kardialen Umstrukturierung assoziiert (Engelhardt et al., 1999; W. Z. Zhu et al., 2003; M. Zhao et al., 2011). Bei der Untersuchung der RKIP-vermittelten Effekte wird deutlich, dass auch RKIP die Signalwege der  $\beta$ AR verstärkt. Dies zeigen die schon besprochenen Effekte auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege. Trotzdem zeigen sich in diesem Modell keine maladaptiven sondern im Gegenteil protektive Effekte, da die Desensitivierung verhindert wird.

Einige erfolgversprechende therapeutische Angriffspunkte sind bekannt. Sie haben die Erhöhung des SERCA2-vermittelten Calciumtransports in das SR als Grundlage. Dazu gehören die SERCA2-Expression (del Monte et al., 2001; Kranias und Hajjar, 2012), die Deletion des PLN (T. Zhang et al., 2010) oder die Expression des S100A1. Dieser Angriffspunkt scheint mit dem Hauptmechanismus der Kontraktilitätssteigerung in RKIP-tg Mäusen übereinzustimmen. Die Überexpression von RKIP fördert hauptsächlich die SERCA2-vermittelte Relaxationsphase bzw. den Calciumtransport in das SR ohne Einfluss auf die für die Systole verantwortlichen einwärtsgerichteten Calciumströme oder den auswärtsgerichteten Transport über den NCX zu nehmen. Näher betrachtet unterscheiden sich die einzelnen Modelle. Die PLN-Deletion sowie die SERCA2-



und RKIP-Expression verursachen jeweils eine Erhöhung der basalen Kontraktilität. Die PLN-Deletion ist dabei jedoch ein Sonderfall, da hier auch die Regulierbarkeit des Calciumtransports verloren geht. Es kommt zur maximalen Auslastung der SERCA2, sodass die Relaxationsphase nicht weiter beschleunigt werden kann (Luo et al., 1994). Dies ist eine sehr energieaufwändige Konstellation, was auch die beobachtete Tendenz einer verkürzten Lebensdauer der PLN-KO erklären könnte (Slack et al., 2001).

Die Hochregulation der GRK2 wird als einer der frühen maladaptiven Mechanismen und Ursachen während der Herzinsuffizienz gesehen (Rockman et al., 2002). In der Reihe der Strategien, die einer gesteigerten Aktivität der GRK2 entgegenwirken, stehen neben RKIP auch der GRK2-KO (Matkovich et al., 2006; Raake et al., 2008; Raake et al., 2012), die Expression des  $\beta$ ARKcts (Rockman et al., 1998; Rengo et al., 2009; Volkers et al., 2011) oder Paroxetin (Thal et al., 2012). Durch die Inhibition der GRK2 werden  $\beta$ -adrenerge Signalwege verstärkt und die Desensitivierung gleichzeitig verhindert. So wird die Reaktionsfähigkeit des Herzens erhalten und es werden die Signalwege beider  $\beta$ AR-Subtypen ( $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR) gesteigert (Tilley und Rockman, 2006). Ein Beibehalten des 80:20 Verhältnisses von  $\beta_1$ AR: $\beta_2$ AR ist vorteilhaft, da der Einfluss der  $\beta_2$ AR/ $G\alpha_i$ -Kopplung gering bleibt und die positiv inotrope Wirkung des  $\beta_1$ AR sich durchsetzt (Bristow et al., 1982; Bristow et al., 1989). Die negativen Effekte einer verstärkten  $\beta_2$ AR/ $G\alpha_i$ -Kopplung, d.h. einem Verlust der Kontraktilität während der Herzinsuffizienzentwicklung (W. Zhu et al., 2005) könnte durch Erhaltung der Erregbarkeit der Rezeptoren entgegen gewirkt werden. Durch die RKIP-Expression konnte die Rezeptordichte der  $\beta$ AR trotz Induktion einer Herzinsuffizienz gleich gehalten werden (Abbildung 3.22) und so die Erregbarkeit des Herzens erhalten bleiben. Obwohl RKIP in seiner Wirkungsweise dem GRK-KO sehr ähnlich ist, besitzt es eine Sonderstellung, da es ein endogenes Protein und seine Hochregulation ein endogener Mechanismus in verschiedenen Herzkrankheiten ist. Außerdem kommt es nur im Fall des RKIP zu einer basalen Steigerung der Kontraktilität. Im Gegensatz dazu zeigt der GRK2-KO erst nach Stimulation eine Verbesserung der kontraktilen Funktion. Betrachtet man die weiteren Modelle fällt auf, dass RKIP im Herzen weitere Vorteile besitzt. Der  $\beta$ ARKct wirkt als  $G\beta\gamma$ -Fänger. Er inhibiert zwar die Rekrutierung der GRK2 an den Rezeptor, jedoch werden auch alle anderen  $G\beta\gamma$ -abhängigen Effekte gehemmt. Dadurch kann es zu ungewollten Effekten kommen. So zeigte sich, dass selbst die kontraktilitätssteigernde Wirkung des  $\beta$ ARKct kein  $\beta$ AR-vermittelter Effekt, sondern das Resultat einer  $\beta\gamma$ -abhängigen Disinhibition des LTCC ist (Volkers et al., 2011). Paroxetin zeigt eine spezifische Wirkung gegenüber der GRK2. Ursprünglich ist es jedoch als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer

und damit als Medikament zur Behandlung von Depressionen charakterisiert. Dementsprechend besitzt es unspezifische Wirkungen, die als Therapeutikum von Nachteil sein können. Die hier gezeigte Rezeptor-spezifische Wirkung hebt RKIP in seiner Eignung weiter hervor, da im Gegensatz zu den anderen Arten der GRK2-Inhibition die zytosolischen Angriffspunkte nicht beeinträchtigt werden.

Alles in Allem stellt RKIP eine einzigartige Möglichkeit dar,  $\beta$ -adrenerge Signalwirkung zu verstärken und gleichzeitig die Ansprechbarkeit des Herzens zu erhalten. Es vereint einige Eigenschaften von etablierten Therapiemodellen: a) So verstärkt es die Kontraktilität der  $\beta$ AR; b) es verhindert spezifisch die Desensitivierung der  $\beta$ AR; c) der kontraktilitätssteigernde Effekt ist eine Konsequenz des erhöhten Calciumtransport über die SERCA2, d) maladaptive Signale des  $\beta_1$ AR werden lokal durch den  $\beta_2$ AR inhibiert.

### 4.5 Ausblick

Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit konnte ein umfassendes Bild der Rolle des RKIP auf kardiale Signalwege erstellt werden. Daraus ergeben sich jedoch auch neue Fragestellungen, die die zukünftige Forschung beeinflussen werden.

- Die erfolgreiche AAV9-Therapie legt erste Grundsteine für weiterführende Versuche mit RKIP als Therapeutikum in der Herzinsuffizienz. Das hier untersuchte Modell entspricht nicht unbedingt der Situation im Menschen, bei dem das Therapeutikum direkt mit dem Einsetzen der erhöhten Nachlast gegeben wird. Es müssen deshalb weitere Versuche folgen, in denen zunächst durch Aortenkonstriktion eine Herzinsuffizienz verursacht wird und diese erst nachträglich mit einer AAV9-vermittelten Erhöhung der RKIP-Transkription therapiert wird. Es wäre von besonderem Interesse, ob RKIP in der Lage ist, eine weitere Verschlechterung zu stoppen oder sogar in Teilen umzukehren. Diese Langzeitversuche sind eine Voraussetzung für Versuche in Großtieren wie Schweinen oder Schafen und die mögliche Untersuchung von RKIP im Menschen.

Für die humane Anwendung ist vor allem die Übertragbarkeit vom Tiermodell wichtig. Es bleibt fraglich, ob die dargestellten Mechanismen im humanen *Cardiac remodelling* die gleiche Relevanz besitzen. Von Vorteil ist, dass auch im Menschen die Veränderung des Calcium-*Cyclings* einen bedeutenden Anteil an der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz hat (Moalic et al., 1993). Im Hinblick auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege gibt es im murinen und humanen Herzen jedoch Unterschiede. So vermittelt auch der  $\beta_2$ AR im Menschen eine positive Inotropie. Trotzdem konnte eine

Mutation, die die Phosphorylierungsstelle der PKA und damit die Fähigkeit zum Wechsel zu  $G\alpha_i$  Signalwegen mit einer schlechten Prognose in Herzinsuffizienz-Patienten korreliert werden (Liggett et al., 1998).

Neben dem TAC-Modell, welches eine Nachlasterrhöhung verursacht, gibt es weitere Ereignisse und Prozesse, die eine Herzinsuffizienz verursachen. Sehr bekannt ist dabei die Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligation eines Koronargefäßes. In diesem Krankheitsmodell sind andere Entstehungsmechanismen von Bedeutung. Durch die Unterversorgung des Gewebes kommt es zu großem ischämischen Stress und die Veränderungen sind vor allem durch Entzündungsprozesse, Apoptose und Nekrose geprägt. Für den therapeutischen Nutzen wäre es wichtig zu sehen, ob RKIP auch hier protektiv wirkt und eine Kontraktilitätssteigerung vermitteln kann.

- Die GRK2 wird durch die aktuelle Forschung vermehrt mit dem bioenergetischen bzw. metabolischen Misshaushalt in Mitochondrien assoziiert. Während der Herzinsuffizienzentwicklung finden bedeutende Veränderungen in den Mitochondrien statt (siehe Kapitel 1.3.2). Außerdem haben viele Prozesse, die das Zellüberleben beeinflussen ihren Ursprung in den Mitochondrien. Im Fall der GRK2 führt die erhöhte Expression der GRK2 in der Herzinsuffizienzentwicklung zu einer Akkumulation der GRK2 in den Mitochondrien (Hullmann et al., 2016). Dort beeinflusst sie die Fettsäureoxidation negativ, sodass die primäre Energiequelle des Kardiomyozyten weniger nutzbar ist (Sato et al., 2015). Ferner verursacht die GRK2 eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), durch die Apoptose induziert werden kann (Fan et al., 2013). Dadurch, dass RKIP die Hochregulation der GRK2 verhindern kann, könnte es so Einfluss auf diese maladaptiven Mechanismen nehmen. Zusätzlich hat RKIP aber auch eine aktivierende Wirkung auf die Akt und die CaMKII, die bedeutende Rollen in den Mitochondrien haben (Aikawa et al., 2000; Manning und Cantley, 2007; T. Zhang et al., 2010).

Für das Verständnis der RKIP-Funktion haben die Mitochondrien eine Schlüssel-funktion. Da ein dauerhaft erhöhter Energiebedarf, wie er auch bei der andauernden Stimulation von  $\beta$ AR entsteht, zu den metabolischen Veränderungen führt, die ursprünglich in der Herzinsuffizienzentwicklung sind. Der Mechanismus durch den RKIP die positive Inotropie mit dem erhöhter Energiebedarf in den Mitochondrien toleriert wird, könnte wegweisend sein.

- Neben den kardialen Effekten könnte RKIP auch außerhalb des Herzens nützliche

Effekte vermitteln. Im Blick auf  $\beta$ AR könnten Effekte in der Vaskulatur (Eckhart et al., 2002), der Lunge wie auch dem Fettgewebe erwartet werden. Über z.B. die Verstärkung von der  $\alpha_2$  AR-vermittelten Wirkung auf die Katecholaminausschüttung in der Nebenniere könnte RKIP weitere protektive Signalwirkungen haben, da dieser Mechanismus zur Verschlimmerung der Herzinsuffizienz durch eine überschießende Katecholaminstimulation beiträgt. Mittels AAV9- $\beta$ ARKct konnten auf diesem Weg schon Erfolge in Form von verringerten Katecholaminkonzentrationen und verbesserter Kontraktilität nach einem Myokardinfarkt gezeigt werden (Lympopoulos et al., 2008; Dorn, 2009).

Schlussendlich ergeben sich aus den vorgestellten Ergebnissen viele Perspektiven für die Zukunft, die zeigen werden, ob sich RKIP als Therapeutikum oder zumindest als therapeutisches Prinzip durchsetzen kann.

## 5 Zusammenfassung

Das Raf kinase inhibitor protein (RKIP) ist ein Kinaseregulator, der im Herzen eine Präferenz für die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) zeigt. Die Regulation erfolgt durch direkte Interaktion beider Proteine, wird durch eine PKC-Phosphorylierung an Serin 153 des RKIP induziert und inhibiert die GRK2-vermittelte Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die GRK2 desensitiviert GPCR und eine Hemmung der GRK2-Aktivität wirkt sich so positiv auf die Ansprechbarkeit von GPCR aus. Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ AR) sind im Herzen maßgeblich an der Regulation der kardialen Kontraktilität beteiligt. Erste Zusammenhänge zwischen der RKIP-Expression und der kontraktile Antwort von Kardiomyozyten wurden bereits in einer früheren Arbeit untersucht und bestätigt. Sie begründen die Fragestellung nach Effekten einer verstärkten RKIP-Expression auf  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale, Herzfunktion und die Entwicklung der Herzinsuffizienz.

Im Rahmen dieses Projektes konnten die Effekte des RKIP auf  $\beta$ -adrenerge Signalwege detaillierter beschrieben werden. Dabei erwies sich die inhibitorische Funktion auf die GRK2 als Rezeptorspezifisch ohne Einfluss auf zytosolische Angriffspunkte der GRK2 zu nehmen. Verstärkte  $\beta$ -adrenerge Signale zeigten sich in neonatalen Kardiomyozyten an Hand der erhöhten cAMP-Level, PKA-Aktivität, sowie Kontraktionsrate und Relaxationsgeschwindigkeit nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Im Einklang damit konnte eine erhöhte PKA- und CaMKII-Aktivität und eine positive Inotropie in transgenen Tieren, mit herzspezifischer Überexpression von RKIP, beobachtet werden. Durch Messung des Calcium-*Cyclings* in Kardiomyozyten konnte der Phänotyp auf eine verbesserte Rückführung des Calciums, einer daraus resultierenden erhöhten Calciumbelastung des sarkoplasmatischen Retikulums und einem gesteigerten systolischen Calciumspiegel, zurückgeführt werden. Die Untersuchung der Phosphorylierung von Calciumkanälen, L-Typ-Calciumkanal und Ryanodin-Rezeptor 2, die den einwärtsgerichteten Calciumstrom vermitteln konnte ihre Beteiligung an der positiv inotropen Wirkung ausschließen.

Neben dem kontraktile Phänotyp konnten zusätzliche protektive Effekte beobachtet werden. In Modellen, die eine chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation imitieren, bzw. eine Nachlastserhöhung induzieren konnte eine Verringerung der interstitiellen Fibrose und der damit assoziierten Marker, gezeigt werden. Mit Hilfe von *in vivo* EKG-Messungen konn-

te die Neigung zur Ausbildung von Arrhythmien untersucht werden. Auch im Hinblick auf die Anzahl der Extrasystolen waren RKIP-transgene Tiere geschützt. Infolge der Untersuchung der Phänotypen in Deletionshintergründen der einzelnen  $\beta$ AR-Subtypen ( $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR) konnte die positive Inotropie mit den spezifischen Signalwegen des  $\beta_1$ AR assoziiert und die protektiven Effekte gegenüber den Umbauprozessen und der Arrhythmie neigung dem  $\beta_2$ -adrenergen Signalen zugeschrieben werden. Zusätzlich bestätigt sich eine besondere Rolle der  $G\alpha_i$ -Kopplung des  $\beta_2$ AR, durch die er einen hemmenden Einfluss auf die  $\beta_1$ AR-Signale nehmen kann.

Die Untersuchung einiger Marker, die eine physiologische von einer pathologischen Hypertrophie unterscheiden, konnte das in den RKIP-transgenen Mäusen auftretende Wachstum der Kardiomyozyten als kompensatorische und physiologische Hypertrophie charakterisieren. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine ausgeglichene Aktivierung der beiden Rezeptoren hin, die sich gegenseitig regulieren und durch die Inhibition der GRK2 in ihrer Anregbarkeit erhalten bleiben. Mittels einer AAV9-vermittelten Gentherapie konnte das therapeutische Potential dieses Prinzips weiter bestätigt werden, da es die prominentesten Veränderungen während der Herzinsuffizienzentwicklung, wie die Verschlechterung der linksventrikulären Funktion, die Dilatation des linken Ventrikels, die Ausbildung von Lungenödemen und interstitieller Fibrose sowie die Expression von Herzinsuffizienz-assoziierten Genen, verhindern konnte. Auch konnten die Auswirkungen der Deletion des RKIP, die sich durch eine beschleunigte und gravierendere Herzinsuffizienzentwicklung auszeichnet, durch Reexpression von RKIP verhindert werden.

Diese Arbeit kann somit zeigen, dass das RKIP eine ausgeglichene Verstärkung von  $\beta$ -adrenergen Signalwegen verursacht, die positiv inotrop und gleichzeitig protektiv wirkt. Dieses Wirkprinzip könnte ferner eine Strategie zur Erhöhung der Kontraktilität in der Herzinsuffizienz darstellen, die entgegen etablierter Theorien auf der Stimulation beider  $\beta$ AR basiert.

## 6 Summary

The Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a kinase regulator with a preference for the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in the heart. The mechanism is a direct interaction of GRK2 and RKIP, which is triggered by a PKC-mediated phosphorylation at serine 153 of RKIP. By binding the GRK2, RKIP prevents the GRK2-mediated GPCR-phosphorylation and, thus, desensitisation of GPCR. As a result, inhibition of GRK2-activity positively affects the responsiveness of cardiac G protein-coupled receptors (GPCR). The GPCR primarily responsible for the regulation of the cardiac contractility are the  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ AR). Previous work proved an interrelation of RKIP-expression and contractile response of cardiomyocytes and set a basis for the subject of this thesis, dealing with the effects of RKIP-expression on beta-adrenergic signalling, cardiac function and the development of heart failure.

The work describes the impact of RKIP on  $\beta$ -adrenergic signaling in more detail. An important feature of the inhibitory function of RKIP on GRK2 is a specificity for receptor targets ( $\beta$ AR) with no, or only minor, impact on the cytosolic targets of the GRK2. RKIP also increases  $\beta$ -adrenergic signalling. This appears in neonatal cardiac myocytes through an increased cAMP-generation, PKA-activity, contractile action and relaxation velocity after  $\beta$ -adrenergic stimulation. Similarly, RKIP-transgenic mice, with heart specific RKIP-expression, showed higher PKA and CaMKII-activities as well as, a positive inotropy. Analysis of the calcium cycling in these cardiomyocytes provided an explanation for the hypercontractile phenotype: an enhanced calcium reuptake into the sarcoplasmic reticulum (SR), the resulting higher calcium load of the SR and an increased calcium amplitude in the cytosol during the systole cause the augmented contractile force. Furthermore, it could be ruled out, that two inward rectifying channels - L-type calcium channel and Ryanodin Receptor 2 contribute to the positive inotropy in RKIP-transgenic mice.

Besides, the RKIP-expression had additional protective effects in heart failure development, which were investigated by disease models. Hypertrophy was induced by chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation and heart failure by induction of pressure overload. Under these conditions, RKIP could reduce the development of interstitial fibrosis and the expression of associated marker genes. The occurrence of arrhythmias, in particular ectopic beats,

was assessed by the analysis of *in vivo* ECG-traces. Rated by the number of ectopic beats RKIP-transgenic mice were also protected against the induction of arrhythmia. The analysis of RKIP-expression in  $\beta$ AR subtype-KOs ( $\beta_1$ KO,  $\beta_2$ KO) could relate the different effects of RKIP to the signalling pathways of either  $\beta_1$ AR or  $\beta_2$ AR. As a result, RKIP effects the positive inotropy through signals of the  $\beta_1$ AR and the protection against heart failure-related remodelling processes and arrhythmia through signals of the  $\beta_2$ AR. Additionally a major importance could be assigned to the  $G\alpha_i$  coupling of the  $\beta_2$ AR. This capacity of the  $\beta_2$ AR can counteract potentially maladaptive signalling of the  $\beta_1$ AR. A monitored growth of cardiomyocytes of RKIP-transgenic mice was assessed in greater depth using different markers to differentiate physiological from pathological hypertrophy. Thereby the occurring hypertrophy was characterised as physiological and compensatory.

Taken together, these results point towards a balanced activation of both  $\beta$ AR. They influence each other through downstream signals and are protected from desensitisation and loss of  $\beta$ -adrenergic responsiveness through inhibition of the GRK2 by RKIP. To validate the therapeutic potential of this mode of action, an AAV9-mediated gene therapy was conducted. In this setting, RKIP was able to prevent, or strongly reduce the most prominent changes during heart failure development. Among these are the decline of the left ventricular function, dilation of the left ventricle, development of a pulmonary congestion, interstitial fibrosis and the expression of heart failure associated genes. Moreover, the consequences of RKIP deletion, which are reflected in an accelerated and deteriorated heart failure development, could be reversed by the reexpression of RKIP. This work shows, that RKIP induces an even activation of  $\beta$ -adrenergic signalling, which results in a positive inotropy with concomitant protective effects. RKIP's mode of action represents a strategy and bears the possibility to enhance cardiac contractility in the failing heart by stimulation of both  $\beta$ AR, which is contrary to the common belief.



## 7 Literatur

- Aikawa, R., M. Nawano, Y. Gu, H. Katagiri, T. Asano, W. Zhu, R. Nagai und I. Komuro (2000). „Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt“. In: *Circulation* 102.23, S. 2873–9.
- Anderson, M. E., J. H. Brown und D. M. Bers (2011). „CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure“. In: *J Mol Cell Cardiol* 51.4, S. 468–73.
- Angelone, T., Y. Goumon, M. C. Cerra, M. H. Metz-Boutigue, D. Aunis und B. Tota (2006). „The emerging cardioinhibitory role of the hippocampal cholinergic neurostimulating peptide“. In: *J Pharmacol Exp Ther* 318.1, S. 336–44.
- Antos, C. L., N. Frey, S. O. Marx, S. Reiken, M. Gaburjakova, J. A. Richardson, A. R. Marks und E. N. Olson (2001). „Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a“. In: *Circ Res* 89.11, S. 997–1004.
- El-Armouche, A., T. Pamminer, D. Ditz, O. Zolk und T. Eschenhagen (2004). „Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts“. In: *Cardiovasc Res* 61.1, S. 87–93.
- El-Armouche, A., K. Wittköpper, F. Degenhardt, F. Weinberger, M. Didie, I. Melnychenko, M. Grimm, M. Peeck, W. H. Zimmermann, B. Unsold, G. Hasenfuss, D. Dobrev und T. Eschenhagen (2008). „Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy“. In: *Cardiovasc Res* 80.3, S. 396–406.
- Armstrong, S. C. (2004). „Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury“. In: *Cardiovasc Res* 61.3, S. 427–36.
- Backs, J., T. Backs, S. Neef, M. M. Kreusser, L. H. Lehmann, D. M. Patrick, C. E. Grueter, X. Qi, J. A. Richardson, J. A. Hill, H. A. Katus, R. Bassel-Duby, L. S. Maier und E. N. Olson (2009). „The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106.7, S. 2342–7.
- Backs, J., B. C. Worst, L. H. Lehmann, D. M. Patrick, Z. Jebessa, M. M. Kreusser, Q. Sun, L. Chen, C. Heft, H. A. Katus und E. N. Olson (2011). „Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4“. In: *The Journal of Cell Biology* 195.3, S. 403–415.
- Bae, S. und L. Zhang (2005). „Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling“. In: *J Pharmacol Exp Ther* 315.3, S. 1125–35.
- Banfield, M. J., J. J. Barker, A. C. Perry und R. L. Brady (1998). „Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction“. In: *Structure* 6.10, S. 1245–54.
- Banfield, M. J. und R. L. Brady (2000). „The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator“. In: *J Mol Biol* 297.5, S. 1159–70.

- Bauer, P. H., S. Muller, M. Puzicha, S. Pippig, B. Obermaier, E. J. Helmreich und M. J. Lohse (1992). „Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator“. In: *Nature* 358.6381, S. 73–6.
- Beach, S., H. Tang, S. Park, A. S. Dhillon, E. T. Keller, W. Kolch und K. C. Yeung (2008). „Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells“. In: *Oncogene* 27.15, S. 2243–8.
- Beckwith, C. und M. A. Munger (1993). „Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction“. In: *Ann Pharmacother* 27.6, S. 755–66.
- Beebe, S. J., O. Oyen, M. Sandberg, A. Froyso, V. Hansson und T. Jahnsen (1990). „Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis—representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase“. In: *Mol Endocrinol* 4.3, S. 465–75.
- Benovic, J. L., R. H. Strasser, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (1986). „Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83.9, S. 2797–801.
- Bers, D. M. (2006). „Cardiac ryanodine receptor phosphorylation: target sites and functional consequences“. In: *Biochemical Journal* 396.Pt 1, e1–3.
- (2012). „Ryanodine receptor S2808 phosphorylation in heart failure: smoking gun or red herring“. In: *Circ Res* 110.6, S. 796–9.
- Beshir, A. B., G. Ren, A. N. Magpusao, L. M. Barone, K. C. Yeung und G. Fenteany (2010). „Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor-kappaB-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression“. In: *Cancer Lett* 299.2, S. 137–49.
- Biel, M., A. Schneider und C. Wahl (2002). „Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation“. In: *Trends Cardiovasc Med* 12.5, S. 206–12.
- Bisognano, J. D., H. D. Weinberger, T. J. Bohlmeier, A. Pende, M. V. Reynolds, A. Sastravaha, R. Roden, K. Asano, B. C. Blaxall, S. C. Wu, C. Communal, K. Singh, W. Colucci, M. R. Bristow und D. J. Port (2000). „Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice“. In: *J Mol Cell Cardiol* 32.5, S. 817–30.
- Blaufarb, I. S. und E. H. Sonnenblick (1996). „The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling“. In: *Am J Cardiol* 77.13, S. 8c–16c.
- Blayney, L. M., J. L. Jones, J. Griffiths und F. A. Lai (2010). „A mechanism of ryanodine receptor modulation by FKBP12/12.6, protein kinase A, and K201“. In: *Cardiovasc Res* 85.1, S. 68–78.
- Bockaert, J. und J. P. Pin (1999). „Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success“. In: *EMBO J* 18.7, S. 1723–9.
- Böhm, M., T. Eschenhagen, P. Gierschik, K. Larisch, H. Lensche, U. Mende, W. Schmitz, P. Schnabel, H. Scholz und M. Steinfath (1994). „Radioimmunochemical quantification of Gi alpha in right and left ventricles from patients with ischaemic and dilated cardiomyopathy and predominant left ventricular failure“. In: *J Mol Cell Cardiol* 26.2, S. 133–49.

- Boyer, J. L., G. L. Waldo und T. K. Harden (1992). „Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C“. In: *J Biol Chem* 267.35, S. 25451–6.
- Braz, J. C., O. F. Bueno, L. J. De Windt und J. D. Molkentin (2002). „PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)“. In: *J Cell Biol* 156.5, S. 905–19.
- Braz, J. C., K. Gregory, A. Pathak, W. Zhao, B. Sahin, R. Klevitsky, T. F. Kimball, J. N. Lorenz, A. C. Nairn, S. B. Liggett, I. Bodi, S. Wang, A. Schwartz, E. G. Lakatta, A. A. DePaoli-Roach, J. Robbins, T. E. Hewett, J. A. Bibb, M. V. Westfall, E. G. Kranias und J. D. Molkentin (2004). „PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure“. In: *Nat Med* 10.3, S. 248–54.
- Brette, F. und C. Orchard (2003). „T-tubule function in mammalian cardiac myocytes“. In: *Circ Res* 92.11, S. 1182–92.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison und E. B. Stinson (1982). „Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts“. In: *N Engl J Med* 307.4, S. 205–11.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson und E. B. Stinson (1986). „Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure“. In: *Circ Res* 59.3, S. 297–309.
- Bristow, M. R., R. E. Hershberger, J. D. Port, W. Minobe und R. Rasmussen (1989). „Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in non-failing and failing human ventricular myocardium“. In: *Mol Pharmacol* 35.3, S. 295–303.
- Bristow, M. R., W. A. Minobe, M. V. Raynolds, J. D. Port, R. Rasmussen, P. E. Ray und A. M. Feldman (1993). „Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart“. In: *J Clin Invest* 92.6, S. 2737–45.
- Bünemann, M., B. L. Gerhardstein, T. Gao und M. M. Hosey (1999). „Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit“. In: *J Biol Chem* 274.48, S. 33851–4.
- Burchfield, J. S., M. Xie und J. A. Hill (2013). „Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2“. In: *Circulation* 128.4, S. 388–400.
- Camps, M., C. Hou, D. Sidiropoulos, J. B. Stock, K. H. Jakobs und P. Gierschik (1992). „Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits“. In: *Eur J Biochem* 206.3, S. 821–31.
- Cant, S. H. und J. A. Pitcher (2005). „G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton“. In: *Mol Biol Cell* 16.7, S. 3088–99.
- Cargnello, M. und P. P. Roux (2011). „Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases“. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 75.1, S. 50–83.
- Carter, S., J. Colyer und R. Sitsapesan (2006). „Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications

- to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation“. In: *Circ Res* 98.12, S. 1506–13.
- Ceci, M., P. Gallo, M. Santonastasi, S. Grimaldi, M. V. Latronico, A. Pitisci, E. Missol-Kolka, M. C. Scimia, D. Catalucci, D. Hilfiker-Kleiner und G. Condorelli (2007). „Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing angiogenesis and reducing apoptosis“. In: *Cell Death Differ* 14.5, S. 1060–2.
- Centurione, L., A. Antonucci, S. Miscia, A. Grilli, M. Rapino, G. Grifone, V. Di Giacomo, C. Di Giulio, M. Falconi und A. Cataldi (2002). „Age-related death-survival balance in myocardium: an immunohistochemical and biochemical study“. In: *Mech Ageing Dev* 123.4, S. 341–50.
- Chen, X., X. Zhang, H. Kubo, D. M. Harris, G. D. Mills, J. Moyer, R. Berretta, S. T. Potts, J. D. Marsh und S. R. Houser (2005). „Ca<sup>2+</sup> influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes“. In: *Circ Res* 97.10, S. 1009–17.
- Chesley, A., M. S. Lundberg, T. Asai, R. P. Xiao, S. Ohtani, E. G. Lakatta und M. T. Crow (2000). „The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase“. In: *Circ Res* 87.12, S. 1172–9.
- Choi, D. J., W. J. Koch, J. J. Hunter und H. A. Rockman (1997). „Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase“. In: *J Biol Chem* 272.27, S. 17223–9.
- Chruscinski, A. J., D. K. Rohrer, E. Schauble, K. H. Desai, D. Bernstein und B. K. Kobilka (1999). „Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene“. In: *J Biol Chem* 274.24, S. 16694–700.
- Chuang, T. T., L. Paolucci und A. De Blasi (1996). „Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin“. In: *J Biol Chem* 271.45, S. 28691–6.
- Cittadini, A., M. G. Monti, G. Iaccarino, F. Di Rella, P. N. Tsichlis, A. Di Gianni, H. Stromer, D. Sorriento, C. Peschle, B. Trimarco, L. Sacca und G. Condorelli (2006). „Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling“. In: *Gene Ther* 13.1, S. 8–19.
- Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (2002). „Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins“. In: *Prog Neurobiol* 66.2, S. 61–79.
- Cohn, H. I., Y. Xi, S. Pesant, D. M. Harris, T. Hyslop, B. Falkner und A. D. Eckhart (2009). „G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans“. In: *Hypertension* 54.1, S. 71–6.
- Colomer, J. M., L. Mao, H. A. Rockman und A. R. Means (2003). „Pressure overload selectively up-regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo“. In: *Mol Endocrinol* 17.2, S. 183–92.
- Condorelli, G., A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M. A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M. V. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C. M. Croce und Jr. Ross J. (2002). „Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.19, S. 12333–8.

- Corbit, K. C., N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall und M. R. Rosner (2003). „Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein“. In: *J Biol Chem* 278.15, S. 13061–8.
- Currie, S., C. M. Loughrey, M. A. Craig und G. L. Smith (2004). „Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart“. In: *Biochem J* 377.Pt 2, S. 357–66.
- Daaka, Y., L. M. Luttrell und R. J. Lefkowitz (1997). „Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A“. In: *Nature* 390.6655, S. 88–91.
- de Rooij, J., H. Rehmann, M. van Triest, R. H. Cool, A. Wittinghofer und J. L. Bos (2000). „Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs“. In: *J Biol Chem* 275.27, S. 20829–36.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer und J. L. Bos (1998). „Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP“. In: *Nature* 396.6710, S. 474–7.
- Deiss, K., C. Kisker, M. J. Lohse und K. Lorenz (2012). „Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2“. In: *J Biol Chem* 287.28, S. 23407–17.
- del Monte, F., R. J. Hajjar und S. E. Harding (2001). „Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure“. In: *Circ Res* 88.11, E66–7.
- DiBona, G. F. und U. C. Kopp (1997). „Neural control of renal function“. In: *Physiol Rev* 77.1, S. 75–197.
- Dimmeler, S. und A. M. Zeiher (2003). „Exercise and cardiovascular health: get active to AKTivate your endothelial nitric oxide synthase“. In: *Circulation* 107.25, S. 3118–20.
- Dobrev, D. und X. H. Wehrens (2014). „Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: Controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease“. In: *Circ Res* 114.8, 1311–9, discussion 1319.
- Doi, M., M. Yano, S. Kobayashi, M. Kohno, T. Tokuhisa, S. Okuda, M. Suetsugu, Y. Hisamatsu, T. Ohkusa, M. Kohno und M. Matsuzaki (2002). „Propranolol Prevents the Development of Heart Failure by Restoring FKBP12.6-Mediated Stabilization of Ryanodine Receptor“. In: *Circulation* 105.11, S. 1374–1379.
- Donthi, R. V., G. Ye, C. Wu, D. A. McClain, A. J. Lange und P. N. Epstein (2004). „Cardiac expression of kinase-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase inhibits glycolysis, promotes hypertrophy, impairs myocyte function, and reduces insulin sensitivity“. In: *J Biol Chem* 279.46, S. 48085–90.
- Dorn G. W., 2nd (2009). „GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease“. In: *J Mol Med (Berl)* 87.5, S. 455–63.
- Dorn G. W., 2nd, M. C. Souroujon, T. Liron, C. H. Chen, M. O. Gray, H. Z. Zhou, M. Csukai, G. Wu, J. N. Lorenz und D. Mochly-Rosen (1999). „Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.22, S. 12798–803.
- Eckhart, A. D., T. Ozaki, H. Tevaearai, H. A. Rockman und W. J. Koch (2002). „Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in trans-

- genic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure“. In: *Mol Pharmacol* 61.4, S. 749–58.
- Elorza, A., S. Sarnago und Jr. Mayor F. (2000). „Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases“. In: *Mol Pharmacol* 57.4, S. 778–83.
- Engelhardt, S., L. Hein, F. Wiesmann und M. J. Lohse (1999). „Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96.12, S. 7059–64.
- Erickson, J. R. (2014). „Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart“. In: *Front Pharmacol* 5, S. 59.
- Erickson, J. R., M. L. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V. Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O’Donnell, N. Aykin-Burns, M. C. Zimmerman, K. Zimmerman, A. J. Ham, R. M. Weiss, D. R. Spitz, M. A. Shea, R. J. Colbran, P. J. Mohler und M. E. Anderson (2008). „A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation“. In: *Cell* 133.3, S. 462–74.
- Escara-Wilke, J., K. Yeung und E. T. Keller (2012). „Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer“. In: *Cancer Metastasis Rev* 31.3-4, S. 615–20.
- Eschenhagen, T. (2010). „Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure?“ In: *J Clin Invest* 120.12, S. 4197–203.
- Eves, E. M., P. Shapiro, K. Naik, U. R. Klein, N. Trakul und M. R. Rosner (2006). „Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint“. In: *Mol Cell* 23.4, S. 561–74.
- Fan, Q., M. Chen, X. Fang, W. B. Lau, L. Xue, L. Zhao, H. Zhang, Y. H. Liang, X. Bai, H. Y. Niu, J. Ye, Q. Chen, X. Yang und M. Liu (2013). „Aging might augment reactive oxygen species (ROS) formation and affect reactive nitrogen species (RNS) level after myocardial ischemia/reperfusion in both humans and rats“. In: *Age (Dordr)* 35.4, S. 1017–26.
- Ferrero, P., M. Said, G. Sanchez, L. Vittone, C. Valverde, P. Donoso, A. Mattiazzi und C. Mundina-Weilenmann (2007). „Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca<sup>2+</sup>-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release kinetics during beta-adrenergic stimulation“. In: *J Mol Cell Cardiol* 43.3, S. 281–91.
- Fischer, T.H., J. Herting, T. Tirilomis, A. Renner, S. Neef, K. Toischer, D. Ellenberger, A. Förster, J. D. Schmitto, J. Gummert, F. A. Schöndube, G. Hasenfuss, L. S. Maier und S. Sossalla (2013). „Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Protein Kinase A Differentially Regulate Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak in Human Cardiac Pathology“. In: *Circulation* 128.9, S. 970–981.
- Foody, J. M., M. H. Farrell und H. M. Krumholz (2002). „beta-Blocker therapy in heart failure: scientific review“. In: *JAMA* 287.7, S. 883–9.
- Fox, R. (2001). „American Heart Association 2001 scientific sessions: late-breaking science-drug-eluting stents“. In: *Circulation* 104.21, E9052.
- Frayne, J., C. Ingram, S. Love und L. Hall (1999). „Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat“. In: *Cell Tissue Res* 298.3, S. 415–23.

- Freeman, J. L., J. A. Pitcher, X. Li, V. Bennett und R. J. Lefkowitz (2000). „alpha-Actinin is a potent regulator of G protein-coupled receptor kinase activity and substrate specificity in vitro“. In: *FEBS Lett* 473.3, S. 280–4.
- Frey, N. und E. N. Olson (2003). „Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly“. In: *Annu Rev Physiol* 65, S. 45–79.
- Fu, X., S. Koller, J. Abd Alla und U. Quitterer (2013). „Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway“. In: *J Biol Chem* 288.11, S. 7738–55.
- Fu, Y., R. E. Westenbroek, T. Scheuer und W. A. Catterall (2013). „Phosphorylation sites required for regulation of cardiac calcium channels in the fight-or-flight response“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.48, S. 19621–6.
- Fu, Z., P. C. Smith, L. Zhang, M. A. Rubin, R. L. Dunn, Z. Yao und E. T. Keller (2003). „Effects of Raf Kinase Inhibitor Protein Expression on Suppression of Prostate Cancer Metastasis“. In: *Journal of the National Cancer Institute* 95.12, S. 878–889.
- Gerhardstein, B. L., T. S. Puri, A. J. Chien und M. M. Hosey (1999). „Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels“. In: *Biochemistry* 38.32, S. 10361–70.
- Gimenez, M., V. C. Souza, C. Izumi, M. R. Barbieri, R. Chammas, S. M. Oba-Shinjo, M. Uno, S. K. Marie und J. C. Rosa (2010). „Proteomic analysis of low- to high-grade astrocytomas reveals an alteration of the expression level of raf kinase inhibitor protein and nucleophosmin“. In: *Proteomics* 10.15, S. 2812–21.
- Granovsky, A. E., M. C. Clark, D. McElheny, G. Heil, J. Hong, X. Liu, Y. Kim, G. Joachimiak, A. Joachimiak, S. Koide und M. R. Rosner (2009). „Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism“. In: *Mol Cell Biol* 29.5, S. 1306–20.
- Greenberg, B., A. Yaroshinsky, K. M. Zsebo, J. Butler, G. M. Felker, A. A. Voors, J. J. Rudy, K. Wagner und R. J. Hajjar (2014). „Design of a phase 2b trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with advanced heart failure: the CUPID 2 trial (calcium up-regulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease phase 2b)“. In: *JACC Heart Fail* 2.1, S. 84–92.
- Greenhouse, D.D., M.F. Festing, S. Hasan und A.L. Cohen (1990). „Catalogue of inbred strains of rats“. In: *Genetic monitoring of inbred strains of rats*. Hrsg. von H.J. Hedrich. Stuttgart: Gustav Fischer, S. 410–480.
- Grimm, M. und J. H. Brown (2010). „Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII“. In: *J Mol Cell Cardiol* 48.2, S. 322–30.
- Gros, R., J. L. Benovic, C. M. Tan und R. D. Feldman (1997). „G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension“. In: *J Clin Invest* 99.9, S. 2087–93.
- Gross, D. N., A. P. van den Heuvel und M. J. Birnbaum (2008). „The role of FoxO in the regulation of metabolism“. In: *Oncogene* 27.16, S. 2320–36.
- Grueter, C. E., S. A. Abiria, Y. Wu, M. E. Anderson und R. J. Colbran (2008). „Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with iso-

- forms of voltage-gated calcium channel beta subunits“. In: *Biochemistry* 47.6, S. 1760–7.
- Grueter, C. E., R. J. Colbran und M. E. Anderson (2007). „CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction“. In: *J Mol Med (Berl)* 85.1, S. 5–14.
- Guo, T., T. Zhang, R. Mestral und D. M. Bers (2006). „Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes“. In: *Circ Res* 99.4, S. 398–406.
- Gurevich, E. V., J. J. Tesmer, A. Mushegian und V. V. Gurevich (2012). „G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs“. In: *Pharmacol Ther* 133.1, S. 40–69.
- Gustafsson, A. B. und R. A. Gottlieb (2007). „Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart“. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 292.1, S. C45–51.
- Haga, K., H. Ogawa, T. Haga und H. Murofushi (1998). „GTP-binding-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) binds and phosphorylates tubulin“. In: *Eur J Biochem* 255.2, S. 363–8.
- Hain, J., H. Onoue, M. Mayrleitner, S. Fleischer und H. Schindler (1995). „Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle“. In: *J Biol Chem* 270.5, S. 2074–81.
- Harding, V. B., L. R. Jones, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch und H. A. Rockman (2001). „Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.10, S. 5809–14.
- Hasenfuss, G., L. A. Mulieri, P. D. Allen, H. Just und N. R. Alpert (1996). „Influence of isoproterenol and ouabain on excitation-contraction coupling, cross-bridge function, and energetics in failing human myocardium“. In: *Circulation* 94, S. 3155–60.
- Hata, J. A. und W. J. Koch (2003). „Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease“. In: *Mol Interv* 3.5, S. 264–72.
- Hengst, U., H. Albrecht, D. Hess und D. Monard (2001). „The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors“. In: *J Biol Chem* 276.1, S. 535–40.
- Hickox, D. M., G. Gibbs, J. R. Morrison, K. Sebire, K. Edgar, H. H. Keah, K. Alter, K. L. Loveland, M. T. Hearn, D. M. de Kretser und M. K. O’Bryan (2002). „Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2“. In: *Biol Reprod* 67.3, S. 917–27.
- Hill, J. A. und E. N. Olson (2008). „Cardiac Plasticity“. In: *New England Journal of Medicine* 358.13, S. 1370–1380.
- Hohimer, A. R., L. E. Davis und D. C. Hatton (2005). „Repeated daily injections and osmotic pump infusion of isoproterenol cause similar increases in cardiac mass but have different effects on blood pressure“. In: *Can J Physiol Pharmacol* 83.2, S. 191–7.
- Houser, S. R. (2014). „Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: protein kinase A-mediated hyperphosphorylation of the ryanodine receptor at serine 2808 does not alter cardiac contractility or cause heart failure and arrhythmias“. In: *Circ Res* 114.8, 1320–7, discussion 1327.



- Hu, C. J., L. Zhou, J. Zhang, C. Huang und G. M. Zhang (2011). „Immunohistochemical detection of Raf kinase inhibitor protein in normal cervical tissue and cervical cancer tissue“. In: *J Int Med Res* 39.1, S. 229–37.
- Huang, C. C. und J. J. Tesmer (2011). „Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs“. In: *J Biol Chem* 286.10, S. 7715–21.
- Huerta-Yepepe, S., N. K. Yoon, A. Hernandez-Cueto, V. Mah, C. M. Rivera-Pazos, D. Chatterjee, M. I. Vega, E. L. Maresh, S. Horvath, D. Chia, B. Bonavida und L. Goodglick (2011). „Expression of phosphorylated raf kinase inhibitor protein (pRKIP) is a predictor of lung cancer survival“. In: *BMC Cancer* 11, S. 259.
- Huke, S. und D. M. Bers (2008). „Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 376.1, S. 80–5.
- Hullmann, J., C. J. Traynham, R. C. Coleman und W. J. Koch (2016). „The Expanding GRK Interactome: Implications in Cardiovascular Disease and Potential for Therapeutic Development“. In: *Pharmacol Res*.
- Hulme, J. T., R. E. Westenbroek, T. Scheuer und W. A. Catterall (2006). „Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.44, S. 16574–9.
- Hupfeld, C. J. und J. M. Olefsky (2007). „Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins“. In: *Annu Rev Physiol* 69, S. 561–77.
- Ichiki, T. (2006). „Role of cAMP response element binding protein in cardiovascular remodeling: good, bad, or both?“ In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26.3, S. 449–55.
- Inagaki, K., S. Fuess, T. A. Storm, G. A. Gibson, C. F. McTiernan, M. A. Kay und H. Nakai (2006). „Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8“. In: *Mol Ther* 14.1, S. 45–53.
- Interiano, B., R. W. Hyde, M. Hodges und P. N. Yu (1973). „Interrelation between alterations in pulmonary mechanics and hemodynamics in acute myocardial infarction“. In: *J Clin Invest* 52.8, S. 1994–2006.
- Jaber, M., W. J. Koch, H. Rockman, B. Smith, R. A. Bond, K. K. Sulik, Jr. Ross J., R. J. Lefkowitz, M. G. Caron und B. Giros (1996). „Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.23, S. 12974–9.
- Jamnicki-Abegg, M., D. Weihrauch, P. S. Pagel, J. R. Kersten, Z. J. Bosnjak, D. C. Warltier und M. W. Bienengraeber (2005). „Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression“. In: *Anesthesiology* 103.5, S. 1006–14.
- Kan, J. Y., Y. L. Hsu, Y. H. Chen, T. C. Chen, J. Y. Wang und P. L. Kuo (2013). „Gemifloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial drug, inhibits migration and invasion of human colon cancer cells“. In: *Biomed Res Int* 2013, S. 159786.
- Kaslow, H. R. und D. L. Burns (1992). „Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation“. In: *FASEB J* 6.9, S. 2684–90.
- Katz, A. M. (1994). „The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart“. In: *Ann Intern Med* 121.5, S. 363–71.

- Kehat, I. und J. D. Molkentin (2010). „Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation“. In: *Circulation* 122.25, S. 2727–35.
- Kelley, G. G., S. E. Reks, J. M. Ondrako und A. V. Smrcka (2001). „Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector“. In: *EMBO J* 20.4, S. 743–54.
- Kemi, O. J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G. L. Smith, G. Condorelli und O. Ellingsen (2008). „Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy“. In: *J Cell Physiol* 214.2, S. 316–21.
- Kim, Y. K., S. J. Kim, A. Yatani, Y. Huang, G. Castelli, D. E. Vatner, J. Liu, Q. Zhang, G. Diaz, R. Zieba, J. Thaisz, A. Drusco, C. Croce, J. Sadoshima, G. Condorelli und S. F. Vatner (2003). „Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt“. In: *J Biol Chem* 278.48, S. 47622–8.
- Koch, W. J., H. A. Rockman, P. Samama, R. A. Hamilton, R. A. Bond, C. A. Milano und R. J. Lefkowitz (1995). „Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor“. In: *Science* 268.5215, S. 1350–3.
- Kolch, W. (2000). „Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions“. In: *Biochem J* 351 Pt 2, S. 289–305.
- (2005). „Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6.11, S. 827–37.
- Konhilas, J. P., U. Widegren, D. L. Allen, A. C. Paul, A. Cleary und L. A. Leinwand (2005). „Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse“. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289.1, H455–65.
- Koval, O. M., X. Guan, Y. Wu, M. L. Joiner, Z. Gao, B. Chen, I. M. Grumbach, E. D. Luczak, R. J. Colbran, L. S. Song, T. J. Hund, P. J. Mohler und M. E. Anderson (2010). „CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.11, S. 4996–5000.
- Kranias, E. G. und R. J. Hajjar (2012). „Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome“. In: *Circ Res* 110.12, S. 1646–60.
- Kuschel, M., Y. Y. Zhou, H. Cheng, S. J. Zhang, Y. Chen, E. G. Lakatta und R. P. Xiao (1999). „G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling“. In: *J Biol Chem* 274.31, S. 22048–52.
- Kushnir, A. und A. R. Marks (2010). „The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease“. In: *Adv Pharmacol* 59, S. 1–30.
- Lee, V. C., D. C. Rhew, M. Dylan, E. Badamgarav, G. D. Braunstein und S. R. Weingarten (2004). „Meta-analysis: angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction“. In: *Ann Intern Med* 141.9, S. 693–704.
- Lefkowitz, R. J. (1998). „G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization“. In: *J Biol Chem* 273.30, S. 18677–80.
- Lemke, T., A. Welling, C. J. Christel, A. Blaich, D. Bernhard, P. Lenhardt, F. Hofmann und S. Moosmang (2008). „Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in CaV1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice“. In: *J Biol Chem* 283.50, S. 34738–44.
- Levine, T. B., G. S. Francis, S. R. Goldsmith, A. B. Simon und J. N. Cohn (1982). „Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by

- plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure“. In: *Am J Cardiol* 49.7, S. 1659–66.
- Liggett, S. B., S. Cresci, R. J. Kelly, F. M. Syed, S. J. Matkovich, H. S. Hahn, A. Diwan, J. S. Martini, L. Sparks, R. R. Parekh, J. A. Spertus, W. J. Koch, S. L. Kardina und 2nd Dorn G. W. (2008). „A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure“. In: *Nat Med* 14.5, S. 510–7.
- Liggett, S. B., N. M. Tepe, J. N. Lorenz, A. M. Canning, T. D. Jantz, S. Mitarai, A. Yatani und 2nd Dorn G. W. (2000). „Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level“. In: *Circulation* 101.14, S. 1707–14.
- Liggett, S. B., L. E. Wagoner, L. L. Craft, R. W. Hornung, B. D. Hoit, T. C. McIntosh und R. A. Walsh (1998). „The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure“. In: *J Clin Invest* 102.8, S. 1534–9.
- Ling, H., T. Zhang, L. Pereira, C. K. Means, H. Cheng, Y. Gu, N. D. Dalton, K. L. Peterson, J. Chen, D. Bers und J. H. Brown (2009). „Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice“. In: *J Clin Invest* 119.5, S. 1230–40.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (1990). „beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function“. In: *Science* 248.4962, S. 1547–50.
- Lopez, I., E. C. Mak, J. Ding, H. E. Hamm und J. W. Lomasney (2001). „A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway“. In: *J Biol Chem* 276.4, S. 2758–65.
- Lorenz, K., M. J. Lohse und U. Quitterer (2003). „Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2“. In: *Nature* 426.6966, S. 574–9.
- Lorenz, K., E. Schmid und K. Deiss (2014). „RKIP: a governor of intracellular signaling“. In: *Crit Rev Oncog* 19.6, S. 489–96.
- Lorenz, K., J. P. Schmitt, E. M. Schmitteckert und M. J. Lohse (2009). „A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy“. In: *Nat Med* 15.1, S. 75–83.
- Luo, W., I. L. Grupp, J. Harrer, S. Ponniah, G. Grupp, J. J. Duffy, T. Doetschman und E. G. Kranias (1994). „Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation“. In: *Circ Res* 75.3, S. 401–9.
- Lymperopoulos, A., G. Rengo, E. Gao, S. N. Ebert, 2nd Dorn G. W. und W. J. Koch (2010). „Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction“. In: *J Biol Chem* 285.21, S. 16378–86.
- Lymperopoulos, A., G. Rengo, C. Zincarelli, S. Soltys und W. J. Koch (2008). „Modulation of adrenal catecholamine secretion by in vivo gene transfer and manipulation of G protein-coupled receptor kinase-2 activity“. In: *Mol Ther* 16.2, S. 302–7.
- Maier, L. S. und D. M. Bers (2002). „Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond“. In: *J Mol Cell Cardiol* 34.8, S. 919–39.

- Maier, L. S., T. Zhang, L. Chen, J. DeSantiago, J. H. Brown und D. M. Bers (2003). „Transgenic CaMKII $\delta$  overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release“. In: *Circ Res* 92.8, S. 904–11.
- Maillet, M., J. H. van Berlo und J. D. Molkentin (2013). „Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 14.1, S. 38–48.
- Mangmool, S., A. K. Shukla und H. A. Rockman (2010). „beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation“. In: *J Cell Biol* 189.3, S. 573–87.
- Manning, B. D. und L. C. Cantley (2007). „AKT/PKB signaling: navigating downstream“. In: *Cell* 129, S. 1261–1274.
- Maresch, J., P. Birner, M. Zakharinov, K. Toumangelova-Uzeir, S. Natchev und M. Guentchev (2011). „Additive effect on survival of Raf kinase inhibitor protein and signal transducer and activator of transcription 3 in high-grade glioma“. In: *Cancer* 117.11, S. 2499–504.
- Marks, A. R., S. Reiken und S. O. Marx (2002). „Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor?“ In: *Circulation* 105.3, S. 272–5.
- Marks, Andrew R. (2013). „Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics“. In: *The Journal of Clinical Investigation* 123.1, S. 46–52.
- Marx, S. O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt und A. R. Marks (2000). „PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts“. In: *Cell* 101.4, S. 365–76.
- Matkovich, S. J., A. Diwan, J. L. Klanke, D. J. Hammer, Y. Marreez, A. M. Odley, E. W. Brunskill, W. J. Koch, R. J. Schwartz und 2nd Dorn G. W. (2006). „Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling“. In: *Circ Res* 99.9, S. 996–1003.
- Matsui, T., T. Nagoshi und A. Rosenzweig (2003). „Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival“. In: *Cell Cycle* 2.3, S. 220–3.
- Matsui, T. und A. Rosenzweig (2005). „Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt“. In: *J Mol Cell Cardiol* 38.1, S. 63–71.
- Maurer, G., B. Tarkowski und M. Baccarini (2011). „Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities“. In: *Oncogene* 30.32, S. 3477–88.
- McGowan, B. S., E. F. Ciccimaro, T. O. Chan und A. M. Feldman (2003). „The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium“. In: *Cardiovasc Toxicol* 3.3, S. 191–206.
- McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Böhm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher und E. S. C. Committee for Practice Guidelines (2012). „ESC

- Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC“. In: *Eur Heart J* 33.14, S. 1787–847.
- McMurray, J. J. und M. A. Pfeffer (2005). „Heart failure“. In: *Lancet* 365.9474, S. 1877–89.
- Métrich, M., A. Lucas, M. Gastineau, J.-L. Samuel, C. Heymes, E. Morel und F. Lezoualc'h (2008). „Epac Mediates beta-Adrenergic Receptor-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy“. In: *Circulation Research* 102.8, S. 959–965.
- Meyer, T., P. I. Hanson, L. Stryer und H. Schulman (1992). „Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase“. In: *Science* 256.5060, S. 1199–202.
- Milano, C. A., L. F. Allen, H. A. Rockman, P. C. Dolber, T. R. McMinn, K. R. Chien, T. D. Johnson, R. A. Bond und R. J. Lefkowitz (1994). „Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor“. In: *Science* 264.5158, S. 582–6.
- Miragoli, M., N. Salvarani und S. Rohr (2007). „Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue“. In: *Circ Res* 101.8, S. 755–8.
- Miyagi, N., V. P. Rao, D. Ricci, Z. Du, G. W. Byrne, K. R. Bailey, H. Nakai, S. J. Russell und C. G. McGregor (2008). „Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector“. In: *J Heart Lung Transplant* 27.5, S. 554–60.
- Moalic, J. M., D. Charlemagne, P. Mansier, B. Chevalier und B. Swynghedauw (1993). „Cardiac hypertrophy and failure—a disease of adaptation. Modifications in membrane proteins provide a molecular basis for arrhythmogenicity“. In: *Circulation* 87.5 Suppl, S. IV21–6.
- Moffit, J. S., K. Boekelheide, J. M. Sedivy und J. Klysik (2007). „Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury“. In: *J Androl* 28.6, S. 883–90.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant und E. N. Olson (1998). „A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy“. In: *Cell* 93.2, S. 215–28.
- Moore, C. A., S. K. Milano und J. L. Benovic (2007). „Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins“. In: *Annu Rev Physiol* 69, S. 451–82.
- Morimoto, S., O. J. Uchi, M. Kawai, T. Hoshina, Y. Kusakari, K. Komukai, H. Sasaki, K. Hongo und S. Kurihara (2009). „Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca<sup>2+</sup> leak in mouse heart“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 390.1, S. 87–92.
- Most, P., J. Bernotat, P. Ehlermann, S. T. Pleger, M. Reppel, M. Borries, F. Niroomand, B. Pieske, P. M. Janssen, T. Eschenhagen, P. Karczewski, G. L. Smith, W. J. Koch, H. A. Katus und A. Remppis (2001). „S100A1: a regulator of myocardial contractility“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.24, S. 13889–94.
- Al-Mulla, F., M. S. Bitar, J. Feng, S. Park und K. C. Yeung (2012). „A new model for raf kinase inhibitory protein induced chemotherapeutic resistance“. In: *PLoS One* 7.1, e29532.

- Al-Mulla, F., M. S. Bitar, M. Al-Maghrebi, A. I. Behbehani, W. Al-Ali, O. Rath, B. Doyle, K. Y. Tan, A. Pitt und W. Kolch (2011). „Raf kinase inhibitor protein RKIP enhances signaling by glycogen synthase kinase-3beta“. In: *Cancer Res* 71.4, S. 1334–43.
- Neer, E. J. und D. E. Clapham (1988). „Roles of G protein subunits in transmembrane signalling“. In: *Nature* 333.6169, S. 129–34.
- Neves, S. R., P. T. Ram und R. Iyengar (2002). „G protein pathways“. In: *Science* 296.5573, S. 1636–9.
- Niggli, E., N. D. Ullrich, D. Gutierrez, S. Kyrychenko, E. Polakova und N. Shirokova (2013). „Posttranslational modifications of cardiac ryanodine receptors: Ca(2+) signaling and EC-coupling“. In: *Biochim Biophys Acta* 1833.4, S. 866–75.
- Nikolaev, V. O., A. Moshkov, A. R. Lyon, M. Miragoli, P. Novak, H. Paur, M. J. Lohse, Y. E. Korchev, S. E. Harding und J. Gorelik (2010). „Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation“. In: *Science* 327.5973, S. 1653–7.
- Oestreich, E. A., S. Malik, S. A. Goonasekera, B. C. Blaxall, G. G. Kelley, R. T. Dirksen und A. V. Smrcka (2009). „Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca<sup>2+</sup> release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II“. In: *J Biol Chem* 284.3, S. 1514–22.
- Ojika, K., S. Mitake, N. Tohdoh, S. H. Appel, Y. Otsuka, E. Katada und N. Matsukawa (2000). „Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP)“. In: *Prog Neurobiol* 60.1, S. 37–83.
- Okita, K., N. Matsukawa, M. Maki, H. Nakazawa, E. Katada, M. Hattori, H. Akatsu, C. V. Borlongan und K. Ojika (2009). „Analysis of DNA variations in promoter region of HCNP gene with Alzheimer’s disease“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 379.2, S. 272–6.
- Oldham, W. M. und H. E. Hamm (2006). „Structural basis of function in heterotrimeric G proteins“. In: *Q Rev Biophys* 39.2, S. 117–66.
- Olivetti, G., R. Abbi, F. Quaini, J. Kajstura, W. Cheng, J. A. Nitahara, E. Quaini, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, S. Krajewski, J. C. Reed und P. Anversa (1997). „Apoptosis in the failing human heart“. In: *N Engl J Med* 336.16, S. 1131–41.
- Ono, K., M. Yano, T. Ohkusa, M. Kohno, T. Hisaoka, T. Tanigawa, S. Kobayashi, M. Kohno und M. Matsuzaki (2000). „Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca<sup>2+</sup> release in heart failure“. In: *Cardiovascular Research* 48.2, S. 323–331.
- Orchard, C. und F. Brette (2008). „t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes“. In: *Cardiovasc Res* 77.2, S. 237–44.
- Pacak, C. A., C. S. Mah, B. D. Thattaliyath, T. J. Conlon, M. A. Lewis, D. E. Cloutier, I. Zolotukhin, A. F. Tarantal und B. J. Byrne (2006). „Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo“. In: *Circ Res* 99.4, e3–9.
- Park, D., D. Y. Jhon, C. W. Lee, K. H. Lee und S. G. Rhee (1993). „Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits“. In: *J Biol Chem* 268.7, S. 4573–6.

- Patial, S., J. Luo, K. J. Porter, J. L. Benovic und N. Parameswaran (2010). „G-protein-coupled-receptor kinases mediate TNF $\alpha$ -induced NF $\kappa$ B signalling via direct interaction with and phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ “. In: *Biochem J* 425.1, S. 169–78.
- Pearce, L. R., D. Komander und D. R. Alessi (2010). „The nuts and bolts of AGC protein kinases“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11.1, S. 9–22.
- Penela, P., C. Murga, C. Ribas, V. Lafarga und F. Mayor (2010). „The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets“. In: *British Journal of Pharmacology* 160.4, S. 821–832.
- Penela, P., C. Murga, C. Ribas, A. S. Tutor, S. Peregrín und F. Mayor (2006). „Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease“. In: *Cardiovascular Research* 69.1, S. 46–56.
- Pereira, L., M. Metrich, M. Fernandez-Velasco, A. Lucas, J. Leroy, R. Perrier, E. Morel, R. Fischmeister, S. Richard, J. P. Benitah, F. Lezoualc'h und A. M. Gomez (2007). „The cAMP binding protein Epac modulates Ca<sup>2+</sup> sparks by a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes“. In: *J Physiol* 583.Pt 2, S. 685–94.
- Pierce, K. L., R. T. Premont und R. J. Lefkowitz (2002). „Seven-transmembrane receptors“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3.9, S. 639–50.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman und R. J. Lefkowitz (1998). „G protein-coupled receptor kinases“. In: *Annu Rev Biochem* 67, S. 653–92.
- Pitcher, J. A., J. Inglese, J. B. Higgins, J. L. Arriza, P. J. Casey, C. Kim, J. L. Benovic, M. M. Kwatra, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (1992). „Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors“. In: *Science* 257.5074, S. 1264–7.
- Pitcher, J. A., J. J. Tesmer, J. L. Freeman, W. D. Capel, W. C. Stone und R. J. Lefkowitz (1999). „Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases“. In: *J Biol Chem* 274.49, S. 34531–4.
- Pitt, G. S. (2007). „Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels“. In: *Cardiovasc Res* 73.4, S. 641–7.
- Pleger, S. T., P. Most und H. A. Katus (2007). „S100 proteins: a missing piece in the puzzle of heart failure?“ In: *Cardiovasc Res* 75.1, S. 1–2.
- Pleger, S. T., C. Shan, J. Ksienzyk, R. Bekeredjian, P. Boekstegers, R. Hinkel, S. Schinkel, B. Leuchs, J. Ludwig, G. Qiu, C. Weber, P. Raake, W. J. Koch, H. A. Katus, O. J. Muller und P. Most (2011). „Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model“. In: *Sci Transl Med* 3.92, 92ra64.
- Pourageaud, F., V. Leblais, N. Bellance, R. Marthan und B. Müller (2005). „Role of beta2-adrenoceptors (beta-AR), but not beta1-, beta3-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery“. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372.1, S. 14–23.
- Pronin, A. N., A. J. Morris, A. Surguchov und J. L. Benovic (2000). „Synucleins Are a Novel Class of Substrates for G Protein-coupled Receptor Kinases“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.34, S. 26515–26522.

- Raake, P. W., L. E. Vinge, E. Gao, M. Boucher, G. Rengo, X. Chen, Jr. DeGeorge B. R., S. Matkovich, S. R. Houser, P. Most, A. D. Eckhart, 2nd Dorn G. W. und W. J. Koch (2008). „G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure“. In: *Circ Res* 103.4, S. 413–22.
- Raake, P. W., X. Zhang, L. E. Vinge, H. Brinks, E. Gao, N. Jaleel, Y. Li, M. Tang, P. Most, 2nd Dorn G. W., S. R. Houser, H. A. Katus, X. Chen und W. J. Koch (2012). „Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca<sup>2+</sup> handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction“. In: *Circulation* 125.17, S. 2108–18.
- Rababa'h, A., S. Singh, S. V. Suryavanshi, S. E. Altarabsheh, S. V. Deo und B. K. McConnell (2015). „Compartmentalization role of A-kinase anchoring proteins (AKAPs) in mediating protein kinase A (PKA) signaling and cardiomyocyte hypertrophy“. In: *Int J Mol Sci* 16.1, S. 218–29.
- Razeghi, P., M. E. Young, S. Abbasi und H. Taegtmeyer (2001). „Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 287.1, S. 5–10.
- Reiken, S., M. Gaburjakova, S. Guatimosim, A. M. Gomez, J. D'Armiento, D. Burkhoff, J. Wang, G. Vassort, W. J. Lederer und A. R. Marks (2003). „Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol“. In: *J Biol Chem* 278.1, S. 444–53.
- Reisine, T. (1990). „Pertussis toxin in the analysis of receptor mechanisms“. In: *Biochem Pharmacol* 39.10, S. 1499–504.
- Reiter, E. und R. J. Lefkowitz (2006). „GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling“. In: *Trends Endocrinol Metab* 17.4, S. 159–65.
- Ren, J. und L. E. Wold (2001). „Measurement of Cardiac Mechanical Function in Isolated Ventricular Myocytes from Rats and Mice by Computerized Video-Based Imaging“. In: *Biol Proced Online* 3, S. 43–53.
- Rengo, G., A. Lymperopoulos, C. Zincarelli, M. Donniacuo, S. Soltys, J. E. Rabinowitz und W. J. Koch (2009). „Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure“. In: *Circulation* 119.1, S. 89–98.
- Respress, J. L., R. J. van Oort, N. Li, N. Rolim, S. S. Dixit, A. de Almeida, N. Voigt, W. S. Lawrence, D. G. Skapura, K. Skardal, U. Wisloff, T. Wieland, X. Ai, S. M. Pogwizd, D. Dobrev und X. H. Wehrens (2012). „Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression“. In: *Circ Res* 110.11, S. 1474–83.
- Ribas, C., P. Penela, C. Murga, A. Salcedo, C. Garcia-Hoz, M. Jurado-Pueyo, I. Aymerich und Jr. Mayor F. (2007). „The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling“. In: *Biochim Biophys Acta* 1768.4, S. 913–22.
- Rockman, H. A., K. R. Chien, D. J. Choi, G. Iaccarino, J. J. Hunter, Jr. Ross J., R. J. Lefkowitz und W. J. Koch (1998). „Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.12, S. 7000–5.



- Rockman, H. A., W. J. Koch und R. J. Lefkowitz (2002). „Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function“. In: *Nature* 415.6868, S. 206–12.
- Rockman, H. A., R. S. Ross, A. N. Harris, K. U. Knowlton, M. E. Steinhilper, L. J. Field, Jr. Ross J. und K. R. Chien (1991). „Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88.18, S. 8277–81.
- Rohrer, D. K., K. H. Desai, J. R. Jasper, M. E. Stevens, Jr. Regula D. P., G. S. Barsh, D. Bernstein und B. K. Kobilka (1996). „Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.14, S. 7375–80.
- Rona, G. (1985). „Catecholamine cardiotoxicity“. In: *J Mol Cell Cardiol* 17.4, S. 291–306.
- Roskoski R., Jr. (2010). „RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 399.3, S. 313–7.
- Ross J., Jr., T. Miura, M. Kambayashi, G. P. Eising und K. H. Ryu (1995). „Adrenergic control of the force-frequency relation“. In: *Circulation* 92.8, S. 2327–32.
- Rosse, C., M. Linch, S. Kermorgant, A. J. Cameron, K. Boeckeler und P. J. Parker (2010). „PKC and the control of localized signal dynamics“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11.2, S. 103–12.
- Ruffolo R. R., Jr. (1993). „Medicinal chemistry of adrenoceptor agonists“. In: *Drug Des Discov* 9.3-4, S. 351–67.
- Ruppert, C., K. Deiss, S. Herrmann, M. Vidal, M. Oezkur, A. Gorski, F. Weidemann, M. J. Lohse und K. Lorenz (2013). „Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.18, S. 7440–5.
- Sag, C. M., D. P. Wadsack, S. Khabbazzadeh, M. Abesser, C. Grefe, K. Neumann, M. K. Opiela, J. Backs, E. N. Olson, J. H. Brown, S. Neef, S. K. Maier und L. S. Maier (2009). „Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure“. In: *Circ Heart Fail* 2.6, S. 664–75.
- Sallese, M., L. Iacovelli, A. Cumashi, L. Capobianco, L. Cuomo und A. De Blasi (2000). „Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins“. In: *Biochim Biophys Acta* 1498.2-3, S. 112–21.
- Sarnago, S., A. Elorza und Jr. Mayor F. (1999). „Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase“. In: *J Biol Chem* 274.48, S. 34411–6.
- Sato, P. Y., J. K. Chuprun, M. Schwartz und W. J. Koch (2015). „The evolving impact of g protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease“. In: *Physiol Rev* 95.2, S. 377–404.
- Schmid, E., S. Neef, C. Berlin, A. Tomasovic, K. Kahlert, P. Nordbeck, K. Deiss, S. Denzinger, S. Herrmann, E. Wettwer, M. Weidendorfer, D. Becker, F. Schäfer, N. Wagner, S. Ergün, J. P. Schmitt, H. A. Katus, F. Weidemann, U. Ravens, C. Maack, L. Hein, G. Ertl, O. J. Müller, L. S. Maier, M. J. Lohse und K. Lorenz (2015). „Cardiac RKIP induces a beneficial beta-adrenoceptor-dependent positive inotropy“. In: *Nat Med* 21.11, S. 1298–306.

- Schmidt, M., S. Evellin, P. A. Weernink, F. vom Dorp, H. Rehmann, J. W. Lomasney und K. H. Jakobs (2001). „A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase“. In: *Nat Cell Biol* 3.11, S. 1020–4.
- Scott, J. D. (1991). „Cyclic nucleotide-dependent protein kinases“. In: *Pharmacol Ther* 50.1, S. 123–45.
- Sedivy, J. M. (2011). „Phosphatidylethanolamine Binding Protein aka Raf Kinase Inhibitor Protein: A Brief History of Its Discovery and the Remarkable Diversity of Biological Functions“. In: *For Immunopathol Dis Therap* 2.1, S. 1–12.
- Seibold, Anita, Bruce Williams, Zai-Feng Huang, Jackie Friedman, Robert H. Moore, Brian J. Knoll und Richard B. Clark (2000). „Localization of the Sites Mediating Desensitization of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor by the GRK Pathway“. In: *Molecular Pharmacology* 58.5, S. 1162–1173.
- Shan, J., A. Kushnir, M. J. Betzenhauser, S. Reiken, J. Li, S. E. Lehnart, N. Lindegger, M. Mongillo, P. J. Mohler und A. R. Marks (2010). „Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice“. In: *J Clin Invest* 120.12, S. 4388–98.
- Shiferaw, Y., G. L. Aistrup und J. A. Wasserstrom (2012). „Intracellular Ca<sup>2+</sup> waves, afterdepolarizations, and triggered arrhythmias“. In: *Cardiovasc Res* 95.3, S. 265–8.
- Simmerman, H. K. und L. R. Jones (1998). „Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function“. In: *Physiol Rev* 78.4, S. 921–47.
- Simon, M. I., M. P. Strathmann und N. Gautam (1991). „Diversity of G proteins in signal transduction“. In: *Science* 252.5007, S. 802–8.
- Singh, A., D. Hamedinger, J. C. Hoda, M. Gebhart, A. Koschak, C. Romanin und J. Striessnig (2006). „C-terminal modulator controls Ca<sup>2+</sup>-dependent gating of Ca(v)1.4 L-type Ca<sup>2+</sup> channels“. In: *Nat Neurosci* 9.9, S. 1108–16.
- Singh, K., L. Xiao, A. Remondino, D. B. Sawyer und W. S. Colucci (2001). „Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis“. In: *J Cell Physiol* 189.3, S. 257–65.
- Skalhegg, B. S. und K. Tasken (2000). „Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA“. In: *Front Biosci* 5, S. D678–93.
- Skinner, J. J. und M. R. Rosner (2014). „RKIP structure drives its function: a three-state model for regulation of RKIP“. In: *Crit Rev Oncog* 19.6, S. 483–8.
- Slack, J. P., I. L. Grupp, R. Dash, D. Holder, A. Schmidt, M. J. Gerst, T. Tamura, C. Tilgmann, P. F. James, R. Johnson, A. M. Gerdes und E. G. Kranias (2001). „The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging“. In: *J Mol Cell Cardiol* 33.5, S. 1031–40.
- Smrcka, A. V. (2008). „G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling“. In: *Cell Mol Life Sci* 65.14, S. 2191–214.
- Solaro, R. J., A. J. Moir und S. V. Perry (1976). „Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart“. In: *Nature* 262.5569, S. 615–7.
- Song, C., C. D. Hu, M. Masago, K. Kariyai, Y. Yamawaki-Kataoka, M. Shibatohe, D. Wu, T. Satoh und T. Kataoka (2001). „Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras“. In: *J Biol Chem* 276.4, S. 2752–7.

- Spinale, F. G. (2007). „Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function“. In: *Physiol Rev* 87.4, S. 1285–342.
- Spinarova, L. und J. Vitovec (2007). „Neurohumoral changes in chronic heart failure“. In: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 151.2, S. 201–7.
- Stephens, L., A. Smrcka, F. T. Cooke, T. R. Jackson, P. C. Sternweis und P. T. Hawkins (1994). „A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits“. In: *Cell* 77.1, S. 83–93.
- Striessnig, J., A. Pinggera, G. Kaur, G. Bock und P. Tuluc (2014). „L-type Ca channels in heart and brain“. In: *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3.2, S. 15–38.
- Sucharov, C. C., P. D. Mariner, K. R. Nunley, C. Long, L. Leinwand und M. R. Bristow (2006). „A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction“. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291.3, H1299–308.
- Sulakhe, P. V. und X. T. Vo (1995). „Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization“. In: *Mol Cell Biochem* 149-150, S. 103–26.
- Sussman, M. A., M. Völkers, K. M. Fischer, B. Bailey, C. T. Cottage, S. Din, N. Gude, D. Avitabile, R. Alvarez, B. Sundararaman, P. Quijada, M. Mason, M. H. Konstandin, A. Malhowski, Z. Cheng, M. Khan und M. McGregor (2011). „Myocardial AKT: The Omnipresent Nexus“. In: *Physiological Reviews* 91.3, S. 1023–1070.
- Swynghedauw, B. (1999). „Molecular mechanisms of myocardial remodeling“. In: *Physiol Rev* 79.1, S. 215–62.
- Tacon, C. L., J. McCaffrey und A. Delaney (2012). „Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials“. In: *Intensive Care Med* 38.3, S. 359–67.
- Taegtmeyer, H., S. Sen und D. Vela (2010). „Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1188, S. 191–198.
- Talan, M. I., I. Ahmet, R. P. Xiao und E. G. Lakatta (2011). „beta(2) AR agonists in treatment of chronic heart failure: long path to translation“. In: *J Mol Cell Cardiol* 51.4, S. 529–33.
- Taniyama, Y., M. Ito, K. Sato, C. Kuester, K. Veit, G. Tremp, R. Liao, W. S. Colucci, Y. Ivashchenko, K. Walsh und I. Shiojima (2005). „Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy“. In: *J Mol Cell Cardiol* 38.2, S. 375–85.
- Taylor, S. S., J. A. Buechler und W. Yonemoto (1990). „cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes“. In: *Annu. Rev. Biochem.* 59, S. 971–1005.
- Teerlink, J. R., J. M. Pfeffer und M. A. Pfeffer (1994). „Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats“. In: *Circ Res* 75, S. 105–13.
- Thal, D. M., K. T. Homan, J. Chen, E. K. Wu, P. M. Hinkle, Z. M. Huang, J. K. Chuprun, J. Song, E. Gao, J. Y. Cheung, L. A. Sklar, W. J. Koch und J. J. G. Tesmer

- (2012). „Paroxetine Is a Direct Inhibitor of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 and Increases Myocardial Contractility“. In: *ACS Chemical Biology* 7.11, S. 1830–1839.
- Tham, Y. K., B. C. Bernardo, J. Y. Ooi, K. L. Weeks und J. R. McMullen (2015). „Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets“. In: *Arch Toxicol* 89.9, S. 1401–38.
- Theeuwes, F. und S. I. Yum (1976). „Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations“. In: *Ann Biomed Eng* 4.4, S. 343–53.
- Theroux, S., M. Pereira, K. S. Casten, R. D. Burwell, K. C. Yeung, J. M. Sedivy und J. Klysik (2007). „Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit“. In: *Brain Res Bull* 71.6, S. 559–67.
- Tilley, D. G. und H. A. Rockman (2006). „Role of beta-adrenergic receptor signaling and desensitization in heart failure: new concepts and prospects for treatment“. In: *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4.3, S. 417–32.
- Timmins, J. M., L. Ozcan, T. A. Seimon, G. Li, C. Malagelada, J. Backs, T. Backs, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, M. E. Anderson und I. Tabas (2009). „Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways“. In: *J Clin Invest* 119.10, S. 2925–41.
- Trakul, N. und M. R. Rosner (2005). „Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein“. In: *Cell Res* 15.1, S. 19–23.
- Vallee, B. S., P. Tauc, J. C. Brochon, R. Maget-Dana, D. Lelievre, M. H. Metz-Boutigue, N. Bureaud und F. Schoentgen (2001). „Behaviour of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein with model membranes. Evidence of affinity for negatively charged membranes“. In: *Eur J Biochem* 268.22, S. 5831–41.
- van Berlo, J. H., M. Maillet und J. D. Molkentin (2013). „Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart“. In: *The Journal of Clinical Investigation* 123.1, S. 37–45.
- van Oort, R. J., M. D. McCauley, S. S. Dixit, L. Pereira, Y. Yang, J. L. Respress, Q. Wang, A. C. DeAlmeida, D. G. Skapura, M. E. Anderson, D. M. Bers und X. H. Wehrens (2010). „Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure“. In: *Circulation* 122.25, S. 2669–79.
- Vidal, M., T. Wieland, M. J. Lohse und K. Lorenz (2012). „beta-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gbetagamma/Erk-dependent pathway“. In: *Cardiovasc Res* 96.2, S. 255–64.
- Volkers, M., C. Weidenhammer, N. Herzog, G. Qiu, K. Spaich, F. von Wegner, K. Peppel, O. J. Muller, S. Schinkel, J. E. Rabinowitz, H. J. Hippe, H. Brinks, H. A. Katus, W. J. Koch, A. D. Eckhart, O. Friedrich und P. Most (2011). „The inotropic peptide betaARKct improves betaAR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through G(betagamma)-mediated L-type calcium current disinhibition“. In: *Circ Res* 108.1, S. 27–39.
- Waagstein, F., M. R. Bristow, K. Swedberg, F. Camerini, M. B. Fowler, M. A. Silver, E. M. Gilbert, M. R. Johnson, F. G. Goss und A. Hjalmarson (1993). „Beneficial

- effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group“. In: *Lancet* 342.8885, S. 1441–6.
- Wang, W., W. Zhu, S. Wang, D. Yang, M. T. Crow, R. P. Xiao und H. Cheng (2004). „Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway“. In: *Circ Res* 95.8, S. 798–806.
- Weber, S., S. Meyer-Roxlau, M. Wagner, D. Dobrev und A. El-Armouche (2015). „Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases“. In: *Front Pharmacol* 6, S. 270.
- Weeks, K. L. und J. R. McMullen (2011). „The athlete’s heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?“ In: *Physiology (Bethesda)* 26.2, S. 97–105.
- Wegener, A. D., H. K. Simmerman, J. P. Lindemann und L. R. Jones (1989). „Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation“. In: *J Biol Chem* 264.19, S. 11468–74.
- Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. R. Reiken und A. R. Marks (2004). „Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor“. In: *Circ Res* 94.6, e61–70.
- Wehrens, X. H., S. E. Lehnart, S. Reiken, J. A. Vest, A. Wronska und A. R. Marks (2006). „Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.3, S. 511–8.
- Wittköpper, K., D. Dobrev, T. Eschenhagen und A. El-Armouche (2011). „Phosphatase-1 inhibitor-1 in physiological and pathological beta-adrenoceptor signalling“. In: *Cardiovasc Res* 91.3, S. 392–401.
- Woo, A. Y. und R. P. Xiao (2012). „beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside“. In: *Acta Pharmacol Sin* 33.3, S. 335–41.
- Xiao, B., M. T. Jiang, M. Zhao, D. Yang, C. Sutherland, F. A. Lai, M. P. Walsh, D. C. Warltier, H. Cheng und S. R. Chen (2005). „Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure“. In: *Circ Res* 96.8, S. 847–55.
- Xiao, R. P. (2000). „Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G(s) and G(i) proteins“. In: *Circ Res* 87.8, S. 635–7.
- Xiao, R. P., P. Avdonin, Y. Y. Zhou, H. Cheng, S. A. Akhter, T. Eschenhagen, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch und E. G. Lakatta (1999). „Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes“. In: *Circ Res* 84.1, S. 43–52.
- Xiao, R. P., C. Hohl, R. Altschuld, L. Jones, B. Livingston, B. Ziman, B. Tantini und E. G. Lakatta (1994). „Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca<sup>2+</sup> dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation“. In: *J Biol Chem* 269.29, S. 19151–6.
- Xiao, R. P., X. Ji und E. G. Lakatta (1995). „Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes“. In: *Mol Pharmacol* 47.2, S. 322–9.

- Yan, H., L. Guoqiang, C. Shengxi, D. Zhenghao und H. Lingjin (2012). „Reduction of Raf Kinase Inhibitor Protein Expression is Associated with Lymph Node Metastasis in Resectable Non-small Cell Lung Cancer“. In: *Open Respir Med J* 6, S. 135–8.
- Yeung, K. C., D. W. Rose, A. S. Dhillon, D. Yaros, M. Gustafsson, D. Chatterjee, B. McFerran, J. Wyche, W. Kolch und J. M. Sedivy (2001). „Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation“. In: *Mol Cell Biol* 21.21, S. 7207–17.
- Yeung, K., P. Janosch, B. McFerran, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy und W. Kolch (2000). „Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein“. In: *Mol Cell Biol* 20.9, S. 3079–85.
- Yeung, K., T. Seitz, S. F. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy und W. Kolch (1999). „Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP“. In: *Nature* 401.6749, S. 173–177.
- Yoshida, A., M. Takahashi, T. Imagawa, M. Shigekawa, H. Takisawa und T. Nakamura (1992). „Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation“. In: *J Biochem* 111.2, S. 186–90.
- Zeng, L., A. Imamoto und M. R. Rosner (2008). „Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target“. In: *Expert Opin Ther Targets* 12.10, S. 1275–87.
- Zhang, R., M. S. Khoo, Y. Wu, Y. Yang, C. E. Grueter, G. Ni, Jr. Price E. E., W. Thiel, S. Guatimosim, L. S. Song, E. C. Madu, A. N. Shah, T. A. Vishnivetskaya, J. B. Atkinson, V. V. Gurevich, G. Salama, W. J. Lederer, R. J. Colbran und M. E. Anderson (2005). „Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease“. In: *Nat Med* 11.4, S. 409–17.
- Zhang, T., T. Guo, S. Mishra, N. D. Dalton, E. G. Kranias, K. L. Peterson, D. M. Bers und J. H. Brown (2010). „Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca(2+) handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKIIdelta(C) transgenic mice“. In: *Circ Res* 106.2, S. 354–62.
- Zhang, T., E. N. Johnson, Y. Gu, M. R. Morissette, V. P. Sah, M. S. Gigena, D. D. Belke, W. H. Dillmann, T. B. Rogers, H. Schulman, Jr. Ross J. und J. H. Brown (2002). „The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity“. In: *J Biol Chem* 277.2, S. 1261–7.
- Zhang, T., M. Kohlhaas, J. Backs, S. Mishra, W. Phillips, N. Dybkova, S. Chang, H. Ling, D. M. Bers, L. S. Maier, E. N. Olson und J. H. Brown (2007). „CaMKIIdelta isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses“. In: *J Biol Chem* 282.48, S. 35078–87.
- Zhang, T., L. S. Maier, N. D. Dalton, S. Miyamoto, Jr. Ross J., D. M. Bers und J. H. Brown (2003). „The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure“. In: *Circ Res* 92.8, S. 912–9.
- Zhang, Y., X. Wang, Z. Xiang, H. Li, J. Qiu, Q. Sun, T. Wan, N. Li, X. Cao und J. Wang (2007). „Promotion of cellular migration and apoptosis resistance by a mouse

- eye-specific phosphatidylethanolamine-binding protein“. In: *Int J Mol Med* 19.1, S. 55–63.
- Zhao, J. und S. Wenzel (2014). „Interactions of RKIP with inflammatory signaling pathways“. In: *Crit Rev Oncog* 19.6, S. 497–504.
- Zhao, M., G. Fajardo, T. Urashima, J. M. Spin, S. Poorfarahani, V. Rajagopalan, D. Huynh, A. Connolly, T. Quertermous und D. Bernstein (2011). „Cardiac pressure overload hypertrophy is differentially regulated by beta-adrenergic receptor subtypes“. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301.4, H1461–70.
- Zhu, W. Z., S. Q. Wang, K. Chakir, D. Yang, T. Zhang, J. H. Brown, E. Devic, B. K. Kobilka, H. Cheng und R. P. Xiao (2003). „Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II“. In: *J Clin Invest* 111.5, S. 617–25.
- Zhu, W. Z., M. Zheng, W. J. Koch, R. J. Lefkowitz, B. K. Kobilka und R. P. Xiao (2001). „Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.4, S. 1607–12.
- Zhu, W., N. Petrashevskaya, S. Ren, A. Zhao, K. Chakir, E. Gao, J. K. Chuprun, Y. Wang, M. Talan, 2nd Dorn G. W., E. G. Lakatta, W. J. Koch, A. M. Feldman und R. P. Xiao (2012). „Gi-biased beta2AR signaling links GRK2 upregulation to heart failure“. In: *Circ Res* 110.2, S. 265–74.
- Zhu, W., X. Zeng, M. Zheng und R. P. Xiao (2005). „The enigma of beta2-adrenergic receptor Gi signaling in the heart: the good, the bad, and the ugly“. In: *Circ Res* 97.6, S. 507–9.
- Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo und J. E. Rabinowitz (2008). „Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection“. In: *Mol Ther* 16.6, S. 1073–80.





## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>AC</b>	Adenylyclase
<b>AKAP</b>	A-Kinase-Ankerprotein
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>βAR</b>	β-adrenerger Rezeptor/β-adrenerge Rezeptoren
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>Epac</b>	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
<b>ERM</b>	Ezrin/Radixin/Moesin-Proteinfamilie
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum
<b>GDP/GTP</b>	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
<b>GEF</b>	GTP Austauschfaktor
<b>GFP</b>	Grün-fluoreszierendes Protein
<b>G-Protein</b>	GTP-bindendes Protein
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
<b>GRK</b>	GPCR-Kinase
<b>GSK</b>	Glykogensynthase Kinase 3
<b>HCNP</b>	<i>Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide</i>
<b>ICM/DCM</b>	Ischämische/Dilatative Kardiomyopathie
<b>IκB</b>	Inhibitor von NFκB
<b>IKK</b>	IκB Kinase

<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrisphosphat
<b>Iso</b>	Isoprenalin
<b>LacZ</b>	LacZ- $\beta$ -Galactosidase
<b>LTCC</b>	L-Typ Calciumkanal
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
<b>MEK</b>	MAPK und ERK Kinase
<b>MHC/MLC</b>	Myosin schwere/leichte Kette
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>NIK</b>	NF $\kappa$ B-induzierende Kinase
<b>PKA/B/C</b>	Protein Kinase A/B/C
<b>PEBP</b>	Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinasen
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
<b>PLN</b>	Phospholamban
<b>PP</b>	Protein Phosphatase
<b>RIA</b>	<i>Radioimmunassay</i>
<b>RKIP</b>	Raf Kinase Inhibitor Protein
<b>RyR</b>	Ryanodin Rezeptor
<b>SERCA</b>	Sarco-/endoplasmatisches Retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPase,
<b>SR</b>	Sarkoplasmatisches Retikulum
<b>TAC</b>	transversale Aortenkonstriktion
<b>TAK</b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrose Faktor $\alpha$
<b>TnI</b>	Troponin I
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>Wt</b>	Wildtyp

## 8.2 Pufferzusammensetzungen

10x PBS:	1,37M NaCl 27mM KCl 0,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O 15mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PFA(4%):	750mM Paraformaldehyd 1xPBS
10xSDS:	250mM Tris 1,92M Glycin 0,01% SDS
4x Ladepuffer:	200mM Tris-HCl (pH 6,8) 8% (m/v) SDS 40% (m/v) Glycerin 20% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,05% (m/v) Bromphenolblau
4x Sammelgelpuffer:	0,5M Tris (pH 6,8) 0,4% (m/v) SDS
4x Trenngelpuffer:	1,5M Tris (pH 8,8) 0,4% (m/v) SDS
Transferpuffer:	20% Methanol 20mM Tris 150mM Glycin
BSA-Waschpuffer:	50mM Tris [pH 7,6] 2,5% Bovines Serum Albumin(BSA) 150mM NaCl 0,2% Nonident P40
Magermilchlösung:	10mM Tris [pH7,6] 5% Magermilchpulver 0,1% Tween 20
10x IBX:	500mM NaF 50mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 10mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,02% NaN <sub>3</sub>

100x Protease Inhibitor:	2mg/ml Trypsininhibitor aus der Sojabohne 3mg/ml Benzamidin 50mM Tris [pH 7,4]
100xPMSF:	100mM PMSF in 99% Ethanol
2xTSE-Puffer:	100mM Tris [pH 7,4] (HCl) 600mM NaCl 10mM EDTA 0,02% NaN <sub>3</sub>
Lysepuffer:	1% (v/v) Triton-X-100 1xTSE 1xIBX 1xProtease Inhibitoren 1mM PMSF
Phosphorylierungspuffer:	20mM HEPES 2mM EDTA 1xProtease Inhibitoren
Phosphorylierungspuffer 2:	25mM Tris-HCl [pH7.4] 0,5mM EDTA 0,5mM EGTA 1µg/ml Leupeptin 1µg/ml Aprotinin 1mM PMSF 100µM IBMX
Homogenisierungspuffer:	10mM HEPES [pH7,5] 10mM MgCl <sub>2</sub> 2mM EDTA 400mM KCl 1xProtease Inhibitoren 1mM PMSF
Membranpuffer:	32mM HEPES [pH 7,5] 80mM NaCl 4mM EGTA 4mM EDTA 12,5mM MgCl <sub>2</sub> 1xProtease Inhibitoren

---

	1mM PMSF
HEPES-Puffer:	137mM NaCl 5mM KCl 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> 15mM HEPES/NaOH [pH7,3] 100 µM IBMX
Fokus-Ladepuffer:	9M Urea 4% (w/v) CHAPS 50mM DTT 0,2% (w/v) Ampholyte 0,001% (m/v) Bromphenol-Blau
Denaturierungspuffer:	50mM Tris [pH 8,8] (HCl) 6M Urea 30% (w/v) Glycerol 2% SDS 65mM DTT
Alkylierungspuffer:	50mM Tris [pH 8,8] (HCl) 6M Urea 30% (w/v) Glycerol 2% SDS 215mM Iodacetamid
CBFHH-Puffer:	5,55mM Dextrose 20,06mM HEPES 137mM NaCl 0,34mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 5,36mM KCl 0,44mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,81mM MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin pH 7,4 (NaOH)
Medium (1L):	10,5g MEM [pH7,3] (NaOH) 350mg NaHCO <sub>3</sub> 200µg/ml Vitamin B12
Medium 1:	5% FCS 1% Penicillin/Streptomycin

Medium 2:	5% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,1mM BrdU
Medium 3:	1% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,1mM BrdU
Medium 4:	1% Penicillin/Streptomycin 0,1mM BrdU
Perfusionspuffer:	120mM NaCl 15mM KCl 0,6mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2mM MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 10mM NaHEPES 4,6mM NaHCO <sub>3</sub> 30mM Taurine 10mM BDM 5,5mM Glukose pH 7,3-7,4 (NaOH)
Verdaupuffer:	1xPerfusionspuffer 0,028% Trypsin 0,7mg/ml Kollagenase A 2,1mg/ml Kollagenase D 12,5µM CaCl <sub>2</sub>
Stoppuffer:	1xPerfusionspuffer 10% FCS 12,5µM CaCl <sub>2</sub>
Messpuffer:	137mM NaCl 5,4mM KCl 1,0/1,2mM CaCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 10mM HEPES 5,5mM Glukose pH 7,3-7,4 (NaOH)
Medium adulte KM:	MEM 0,1% (m/v) BSA

100U/mL Penicillin  
100µg/mL Streptomycin  
2mM L-Glutamin  
20mM 2,3-Butanedionemonoxim (BDM)  
1xITS-*Supplement*  
100µM IBMX

Hämatoxylin-Lösung: 1g/l Hämatoxylin  
50g/l  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (Kaliumaluminiumsulfat)  
200mg/l  $\text{NaIO}_3$  (Natriumiodat)  
50g/l  $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$  (Chloralhydrat)  
1g/l  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (Zitronensäure)

Eosin-Lösung: 10g/l Eosin G (gelblich)

Sirius-Rot-Lösung: Direct Red 80 1% (m/v)  
1:10 in gesättigter Pikrinsäure





## 9 Curriculum vitae



## 10 Publikationsverzeichnis

### Zeitschriftenbeiträge:

Schmid E, Neef S, Berlin C, Tomasovic A, Kahlert K, Nordbeck P, Deiss K, Denzinger S, Herrmann S, Wettwer E, Weidendorfer E, Becker D, Schäfer F, Wagner N, Ergün S, Schmitt J, Katus HA, Weidemann F, Ravens U, Maack C, Hein L, Ertl G, Müller OJ, Maier LS, Lohse MJ, & Lorenz K (2015) „Cardiac RKIP causes a beneficial  $\beta$ -adrenoceptor-dependent positive inotropy“. *Nat. Med.* 21.11, S. 1298-306.

Lorenz K, Schmid E, & Deiss K (2014) „RKIP: a governor of intracellular signaling“. *Crit. Rev. Oncog.* 19 (6):489-496.

Lorenz K, Stathopoulou K, Schmid E, Eder P, & Cuello F (2014) „Heart failure-specific changes in protein kinase signalling“. *Pflügers Arch* 466 (6):1151-1162.

### Konferenzbeiträge:

Schmid E, Neef S, Berlin C, Denzinger S, Kahlert K, Weidendorfer M, Schäfer F, Schmitt J, Katus HA, Müller OJ, Maier LS, Lohse MJ, & Lorenz K (2015) “RKIP induces a preserved and beneficial positive inotropy by enhancing  $\beta$ -adrenergic signalling“ The EMBO-Meeting 2015, Birmingham (Poster)

Schmid E, Neef S, Kahlert K, Katus HA, Müller OJ, Maier L, Ravens U, Lohse MJ, & Lorenz K (2015) „RKIP-mediated activation of  $\beta$ -adrenergic receptors prevents the development of pressure overload-induced heart failure“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 388, (S1) S.39:155; DGPT 2015, Kiel (Vortrag)

Schmid E, Deiss K, Denzinger S, Weidendorfer, M, Schmitt JP, Lohse MJ & Lorenz K (2014) „RKIP is mainly phosphorylated at serine 153 and bound to GRK2 under physiological conditions in the heart“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 3, (S1) S.85:341; DGPT 2014, Hannover (Poster)

Schmid E, Lohse MJ, & Lorenz K (2013) „RKIP is part of a positive feedback mechanism in  $\beta$ -adrenergic signaling in the heart“. Dutch German Joint Meeting 2013, Heidelberg (Vortrag, Young Investigator Award (3rd price))

Schmid E, Lohse MJ, & Lorenz K (2013) „The role of RKIP in  $\beta$ -adrenergic signaling in the heart“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 3, (S1) S.71:290 DGPT 2013, Halle (Poster)



## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre freundliche und ausdauernde Unterstützung zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran ist Prof. Dr. Kristina Lorenz zu nennen. Ihr verdanke ich die Möglichkeit zur Promotion, das anspruchsvolle Projekt und die umfassende Betreuung bei der Bearbeitung, sowie eine herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Auch Prof. Dr. Martin Lohse gilt großer Dank, da er das Projekt durch seinen Input stets vorangebracht hat. Prof. Dr. Andreas Schlosser möchte ich für die nette Zusammenarbeit und Hilfe, die ich in seiner Arbeitsgruppe erfahren hab, danken. Ferner möchte ich Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ein weiterer großer Dank gilt der ganzen Arbeitsgruppe um Kristina Lorenz für das nette Arbeitsklima und die stete Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Besonders die technischen Assistentinnen Nadine, Martina, Marianne, Karina und Julia haben durch ihr Fachwissen, ihre Erfahrung, Hilfsbereitschaft und natürlich durch ihre erhebliche praktische Arbeit außerordentlich zum Erfolg des Projektes beigetragen.

Ein sehr persönliches „Danke“ möchte ich an meine Mitdoktoranden und Kollegen richten, die mir stets zur Seite standen und zu Freunden geworden sind. Die Glücksmomente, den „Schito“, das große Maß an Geduld und Verständnis weiß und werde ich immer sehr zu schätzen wissen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich herzlich für die ewige Unterstützung, das Verständnis und die Seifenblasen danken.