

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Martin Lohse**

**Die Untersuchung der kardialen Folgen  
einer ubiquitären Deletion von RKIP  
in Mäusen**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Christopher Berlin**

aus Rietenau

**Würzburg, August 2016**

Referentin:

Prof. Dr. Kristina Lorenz

Korreferent:

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungs - und Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz .....	1
1.2 $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale .....	2
1.2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	3
1.2.1.1 Struktur und Funktion .....	3
1.2.1.2 Subtypen und Expression .....	4
1.2.2 $\beta$ -adrenerge Signalkaskaden im Herzen.....	5
1.2.2.1 Die Wirkung verschiedener Rezeptorsubtypen am Herzen.....	7
1.2.2.2 Regulationsmechanismen im Herzen .....	8
1.3 <i>Rafkinase inhibitor protein</i> .....	9
1.3.1 Expression und Struktur.....	9
1.3.2 Funktion von RKIP .....	11
1.3.2.1 Interaktion mit intrazellulären Signalwegen .....	11
1.3.2.2 Organ- und krankheitsbezogene Funktion von RKIP .....	13
1.3.2.3 Funktion im Herzen.....	14
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	17
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Material .....	18
2.1.1 Tiere .....	18
2.1.2 Chemikalien .....	18
2.1.3 Antikörper .....	21
2.1.4 Oligonukleotide.....	21
2.1.5 Pufferliste .....	22
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Transverse Aortenkonstriktion.....	24
2.2.2 Echokardiographie .....	25
2.2.2.1 Funktionsweise .....	25
2.2.2.2 Darstellungsmethoden .....	26
2.2.2.3 Untersuchungsablauf .....	26
2.2.3 Organentnahmen .....	27
2.2.4 Histologische und morphologische Untersuchungen, TUNEL- Assays .....	28
2.2.4.1 Erstellung von Gewebeschnitten .....	28

2.2.4.2	SiriusRot®-Färbung .....	28
2.2.4.3	HE-Färbung .....	28
2.2.4.4	TUNEL-Färbung .....	29
2.2.4.5	Auswertung histologischer Querschnitte.....	30
2.2.5	Analyse von Proteinexpressionen .....	30
2.2.5.1	Herstellung von Herzlysaten .....	30
2.2.5.2	SDS-Page.....	31
2.2.5.3	Proteintransfer .....	32
2.2.5.4	Immunodetektion.....	32
2.2.6	GRK2-Aktivität.....	33
2.2.6.1	Phosphorylierungsassays .....	33
2.2.7	Analyse von Genexpressionen .....	34
2.2.7.1	RNA-Präparation.....	34
2.2.7.2	Reverse Transkription .....	34
2.2.7.3	<i>Realtime</i> PCR.....	35
2.2.8	Kontraktionsverhalten und Kalziumkinetik isolierter Kardiomyozyten.....	38
2.2.8.1	Präparation adulter Kardiomyozyten.....	38
2.2.8.2	Messungen zur intrazellulären Kalziumkinetik und zum kardiomyozytären Kontraktionsverhalten .....	39
2.2.8.3	Auswertung der gemessenen Daten.....	41
2.2.8.4	Statistische Analysen.....	42
3	Ergebnisse .....	44
3.1	RKIP-Knockout und dessen Einfluss auf die intrazelluläre Signalwege	44
3.1.1	Nachweis des RKIP-Knockout .....	44
3.1.2	Einfluss der Deletion von RKIP auf die kardiale Aktivität der GRK .....	47
3.1.3	Einfluss der Deletion von RKIP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 im Herzen.....	49
3.2	Phänotyp von RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	50
3.2.1	Quantifizierung der durch TAC erzielten Nachlasterhöhung ...	50
3.2.2	Beurteilung der kardialen Pumpfunktion .....	51
3.2.3	Expression von Herzinsuffizienzmarkern .....	54
3.2.4	Kardiales <i>Remodeling</i> in RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	55
3.2.5	Hypertrophie .....	59
3.2.6	Überleben .....	62
3.3	Kalziumkinetik und Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten .....	63
3.3.1	Kalziumkinetik während Kontraktion und Relaxation .....	63
3.3.2	Beurteilung der Kontraktion und Relaxation auf Zellebene .....	64
4	Diskussion .....	67
4.1	Untersuchungen zur ubiquitären Deletion von RKIP .....	67

---

4.2	Untersuchungen zur Interaktion von RKIP mit intrazellulären Signalwegen .....	68
4.3	Phänotypisierung von RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen unter physiologischen Rahmenbedingungen .....	69
4.3	Herzinsuffizienter Phänotyp von RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen unter dem Einfluss von chronischem kardialen Stress .....	70
4.4	Die Rolle von RKIP in humanen Herzerkrankungen .....	72
4.5	Ausblick .....	73
5	Zusammenfassung .....	75
6	Literaturverzeichnis .....	77

## Abbildungen - und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	$\beta$ - adrenerge Signalwege im Herzen .....	6
Abb. 2	Schematisch Darstellung der für PEBP1 kodierenden Gensequenz .....	10
Abb. 3	Beispielhafte intrazelluläre RKIP-Interaktionen .....	12
Abb. 4	Gewebeabhängige RKIP-Funktion in Säugetieren .....	14
Abb. 5	PKC-abhängiger Interaktionswechsel von RKIP.....	15
Abb. 6	Kardiale und systemische Effekte in RKIP <sup>tg</sup> -Mäusen .....	16
Abb. 7	In RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen verwendeter Gen- <i>Trapping</i> -Vektor .....	18
Abb. 8	Schematische Darstellung der transversen Aortenkonstriktion .....	25
Abb. 9	Schematische Darstellung der Echokardiographie .....	26
Abb. 10	Schematische Darstellung der SDS-PAGE .....	32
Abb. 11	Schematische Darstellung der <i>Primer</i> -Platzierung der <i>Realtime</i> PCR ...	37
Abb. 12	Schematische Darstellung der Apparatur zur Messung des Kontraktionsverhaltens und der Kalziumkinetik .....	39
Abb. 13	Anregungs- und Emissionsspektrum von <i>fura-2</i> .....	41
Abb. 14	Schema über Vergleichspunkte der <i>fura-2 ratio</i> .....	42
Abb. 15	Kardiale mRNA Expression von RKIP in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> - Mäusen .....	45
Abb. 16	Schematische Darstellung der für die Genotypisierung verwendeten <i>Primer</i> -Platzierung .....	45
Abb. 17	Deletion von RKIP auf Gen- und Proteinebene .....	46
Abb. 18	Kardiale 2-D-Gelelektrophorese in RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	47
Abb. 19	Kardiale Rhodopsin-Phosphorylierung in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> - Mäusen .....	48
Abb. 20	Exemplarische ERK1/2-Phosphorylierung in Herzen aus Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	49
Abb. 21	Mittels Doppler-Ultraschall bestimmte Druckgradienten über Konstriktion der Aorta .....	51
Abb. 22	Echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Verkürzungsfraction in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	52
Abb. 23	Linksventrikuläre Dilatation in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	53
Abb. 24	Lungengewichte in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	54

---

Abb. 25	Kardiale BNP Expression in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	55
Abb. 26	Linksventrikuläre Fibrosierung in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	57
Abb. 27	Kardiale Kollagen 3 Expression in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	58
Abb. 28	Linksventrikuläre Apoptose in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	59
Abb. 29	Einzelzellgrößen in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	60
Abb. 30	Septumdicke und Herzgewicht in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	61
Abb. 31	Überleben von Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Mäusen nach TAC .....	62
Abb. 32	Kalziumkinetik in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> -Kardiomyozyten .....	64
Abb. 33	Kontraktionsverhalten auf Sarkomerebene in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> - Kardiomyozyten .....	65
Abb. 34	Kontraktionsverhalten auf Zellebene in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> - Kardiomyozyten .....	66
Abb. 35	PKC-abhängiger Interaktionswechsel von RKIP .....	68
Abb. 36	Kalziumkinetik unter $\beta$ -adrenerger Simulation in Wildtyp- und RKIP <sup>-/-</sup> - Kardiomyozyten .....	71
Tab. 1	Übersicht über Lokalisation und Funktion unterschiedlicher GPCR- Subtypen im Menschen .....	5
Tab. 2	Liste der verwendeten Chemikalien .....	18
Tab. 3	Liste der verwendeten Antikörper .....	21
Tab. 4	Liste der verwendeten Primersequenzen .....	21
Tab. 5	Liste der verwendeten Pufferlösungen .....	22

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>	LVIDES	<i>Linksventrikulärer innerer endsystolischer Diameter</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>	MAPK	<i>Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase</i>
ANP	<i>Atriales Natriuretisches Peptid</i>	MyBP-C	<i>Myosin bindendes Protein-C</i>
BCA	<i>Bicinchoninsäure</i>	NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>	NYHA	<i>New York Heart Association</i>
BW	<i>Bodyweight</i>	PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
CFA	<i>Cell Framing Adapter</i>	PEBP	<i>Phosphatidylethanolamin bindendes Protein</i>
C <sub>T</sub>	<i>Threshold cycle</i>	PKA	<i>Proteinkinase A</i>
cTnI	<i>Kardiales Troponin I</i>	PKC	<i>Proteinkinase C</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>	PLN	<i>Phospholamban</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>	PMT	<i>Photo Multiplier</i>
GEF	<i>Guanin-Nucleotide-Exchange-Factor</i>	RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Raf1	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma 1</i>
GPCR	<i>G-Protein-gekoppelter Rezeptor</i>	realtime PCR	<i>Quantitative Polymerasekettenreaktion</i>
GRK	<i>G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase</i>	RKIP	<i>Raf kinase inhibitor protein</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glykogen-Synthase-Kinase 3<math>\beta</math></i>	RyR	<i>Ryanodinrezeptor</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>	SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
HCN	<i>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>	SDS	<i>Natriumaurylsulfat</i>
HCNP	<i>Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide</i>	SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>	SERCA	<i>Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>	SR	<i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i>
HW	<i>Heartweight</i>	TAC	<i>Transverse Aortic Constriction</i>
HZV	<i>Herzzeitvolumen</i>	TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
IEF	<i>Isoelektrische Fokussierung</i>	TL	<i>Tibiallänge</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i>	TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
IVS	<i>Interventrikuläres Septum</i>	UTR	<i>Untranslated region</i>
LGW	<i>Lungengewicht</i>	WHO	<i>World Health Organisation</i>
LTCC	<i>L-Typ-Kalziumkanal</i>	Wnt	<i>Wingless Int1</i>
LVID	<i>Linksventrikulärer innerer Durchmesser</i>		
LVIDED	<i>Linksventrikulärer innerer enddiastolischer Diameter</i>		



ZNS *Zentrales Nervensystem*

$\beta$ -AR  $\beta$ -adrenerger Rezeptor

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird definiert als Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen (HZV) bei normalem enddiastolischen Druck zu fördern. Klinisch äußert sich diese ventrikuläre Funktionsstörung durch eine verminderte körperliche Belastbarkeit (WHO, 2014). Allerdings ist dieses Symptom nur die gemeinsame Endstrecke unterschiedlicher Ätiologien kardialer Schädigung: Neben Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese, Myokarditiden, Klappen- und Herzvitien, ist laut Framingham-Offspring-Studie in 50% der Fälle ein arterieller Hypertonus und damit eine pathologische Erhöhung der Nachlast primäre Ursache der Herzinsuffizienz.

Es kommt in diesen Fällen zur im Folgenden beschriebenen pathologischen Sequenz: Die arterielle Hypertonie führt durch eine Mehrbelastung des Myokards zu einer anfangs konzentrischen muskulären Hypertrophie des Herzens, was wiederum einen erhöhten Sauerstoffbedarf im Herzmuskelgewebe nach sich zieht. Durch mangelnde Angiogenese und embolische Ereignisse in den Herzkranzgefäßen kommt es zum Infarktgeschehen. Oft zieht dieses bei inadäquater, bzw. nicht rechtzeitiger Therapie eine Defektheilung ohne *restitutio ad integrum* nach sich, sodass die Pumpleistung des Herzens dadurch gemindert bleibt und sich eine Herzinsuffizienz ausbilden kann <sup>1</sup>.

Pathophysiologisch kann somit eine Funktionsstörung des linken Ventrikels im Vordergrund stehen, die sich in einer Verminderung des HZV und damit einer Blutunterversorgung der Peripherie äußert: Vorwärtsversagen.

Durch chronische Überlastung des linken Ventrikels kann es allerdings zusätzlich zum verminderten Abtransport des Blutes aus dem Lungenkreislauf und damit zu einer vermehrten Druck- und Vorlumenbelastung des rechten Ventrikels kommen, was sich dann im Verlauf in einem verminderten Abtransport des Blutes aus der Peripherie äußert: Rückwärtsversagen.

Die Kombinationsform aus Linksherz- und Rechtsherzinsuffizienz wird globale Herzinsuffizienz genannt.

Um der Entwicklung einer globalen Herzinsuffizienz mit kombiniertem Vorwärts- und Rückwärtsversagen entgegenzuwirken und eine ausreichende Perfusion der Peri-

pherie aufrecht zu erhalten, stehen dem Körper unterschiedliche Kompensationsmechanismen zur Verfügung: Neben der oben bereits erwähnten konzentrischen Hypertrophie des Myokards ohne Dilatation des Ventrikels bei chronischer Hochdruckbelastung zieht eine Volumenbelastung durch Rückstau des Blutes im Verlauf zusätzlich zu einer exzentrischen Hypertrophie mit Dilatation des Ventrikels. Diese Dilatation führt ihrerseits wiederum zur dehnungsinduzierten Apoptose und begünstigt somit die weitere Entwicklung der Herzinsuffizienz<sup>2</sup>.

Zudem kommt es zu einer neuroendokrinen Sympathikusaktivierung mit einer konsekutiven Mehrausschüttung ino-, lusi- und chronotroper Substanzen wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Dies führt nach kurzer Verbesserung der Symptomatik im Verlauf zu einer Herunterregulierung und Desensitivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren an der Zellmembran der Kardiomyozyten<sup>3</sup> und damit zu einer verminderten Wirksamkeit besagter Hormone, sowie über eine Steigerung des Arteriolentonus zu einem höheren peripheren Widerstand. Zum Erhalt eines ausreichenden Perfusionsdrucks wird desweiteren das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) verstärkt aktiviert und die Synthese und Ausschüttung von Botenstoffen wie Antidiuretischem Hormon gesteigert. Neben einer Zunahme der Nachlast, sowie der Salz- und Wasserretention und damit einer weiteren Steigerung der Druckbelastung des Herzens begünstigen die Hormone des RAAS außerdem die Apoptose und den bindegewebigen Umbau der Herzmuskulatur, das sog. kardiaale *Remodeling*<sup>4</sup>, sodass längerfristig durch eigentliche Kompensationsmechanismen eine weitere Verstärkung der Herzinsuffizienz vorangetrieben wird.

## 1.2 $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale

Für die Vorbereitung einer Fluchtreaktion des Organismus, oder eine adäquate Reaktion auf Stresssituationen ist vor allem der Sympathikus als Teil des autonomen Nervensystems mit Botenstoffen wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin verantwortlich. Diese Katecholamine haben zusammenfassend eine leistungssteigernde, positiv-ergotrope Wirkung auf den Organismus. Zu den organspezifischen, sympathischen Reaktionen unter anderem die Erhöhung des Blutdrucks durch Steigerung der Herzarbeit und Erhöhung des Gefäßtonus (s. Kap. 1.1), die Weitstellung der Pupillen, die Erweiterung der Bronchien, die Steigerung der Glykolyse oder auch die parallele Herunterregulation nicht unmittelbar benötigter Prozesse wie zum Beispiel der Verdauung<sup>2</sup>.

Ermöglicht wird dieses vielfältige Spektrum an Reaktionen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, die unter anderem der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören. Diese werden gewebespezifisch exprimiert und sind in der Lage, durch intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden differenzierte Effekte auszulösen.

## 1.2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

### 1.2.1.1 Struktur und Funktion

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind die größte Familie transmembraner Rezeptoren, und nehmen mit ungefähr 800 Genen ca. 4% des für Proteine kodierenden menschlichen Genoms ein <sup>5</sup>. Sie sind für die Verarbeitung einer Vielzahl physiologischer Prozesse verantwortlich. Unter anderem ist Ihre Funktion entscheidend für verschiedene Sinnesmodalitäten, sie modulieren Entzündungsprozesse, spielen eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung, sind Zielstrukturen hormoneller Botenstoffe und molekularer Angriffspunkt für die Hälfte aller weltweit verordneten Medikamente <sup>6</sup>. Die bekanntesten GPCR sind unter anderem  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, Rhodopsin-, Endothelin- und Adenosinrezeptoren <sup>7</sup>. Die ungefähr 1000 Subtypen können in drei große Subfamilien ähnlicher Sequenz (A, B, C) eingeteilt werden. Alle Mitglieder weisen eine streng konservierte heptahelikale Struktur mit sieben Transmembrandomänen, einem extrazellulär liegenden N-Terminus und einem intrazellulär liegenden C-terminalen Ende auf <sup>8,9</sup>.

Für die Signalwege im Zellinneren wichtige und in der Mehrzahl der Fälle beteiligte Bindungspartner sind mit der Zellmembran assoziierte, gruppiert vorliegende, heterotrimere Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine). Diese bestehen aus einer  $G\alpha$ -, einer  $G\beta$ - und einer  $G\gamma$ -Untereinheit. Im Ruhezustand bindet  $G\alpha$  Guanosindiphosphat (GDP). Eine Vielzahl von extrazellulär an den GPCR bindenden Liganden ist in der Lage, in den transmembranären und intrazellulären Abschnitten des Rezeptors Konformationsänderungen auszulösen <sup>10</sup>. Dies ermöglicht eine dynamische Interaktion mit den heterotrimeren G-Proteinen. Der GPCR selbst kann nun mit Hilfe des oben beschriebenen C-Terminus als *Guanin-Nucleotide-Exchange-Factor* (GEF) fungieren und katalysiert an  $G\alpha$  den Austausch von GDP zu Guanosintriphosphat (GTP). Dies induziert eine Aktivierung von  $G\alpha$ , damit eine Dissoziation der G-Proteine vom GPCR und

eine Loslösung der aktivierten  $\alpha$ -Untereinheit von den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten. Je nach Subtyp der  $\alpha$ -Untereinheiten, die unter anderem den Klassen  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{12/13}$  und  $G\alpha_q$  angehören<sup>11</sup>, sind diese unter anderem in der Lage, Zielmoleküle wie die Adenylatcyclase zu aktivieren ( $G\alpha_s$ ) oder zu inhibieren ( $G\alpha_{i/o}$ ), die Aktivität von RhoGEF zu modulieren ( $G\alpha_{12/13}$ ), oder Einfluss auf die Phospholipase C $\beta$  ( $G\alpha_q$ ) zu nehmen.

Diese Zielmoleküle beeinflussen nun distal in der Kaskade liegende Signale. Entweder durch direkte Molekülinteraktion oder über die Herauf-, oder Herabregulation der Produktion von sogenannten *Second-Messenger*-Molekülen wie z.B. zyklischem Adenosinmonophosphat, Diazylglycerin, oder Inositoltrisphosphat. Nach Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus dem heterotrimeren Proteinkomplex sind zusätzlich auch diese in der Lage, zum Beispiel durch Bindung von Ionenkanälen an der Zellmembran oder der Phospholipase C $\beta$  deren Aktivität zu modulieren und das Spektrum möglicher Signaleffekte zu erweitern<sup>12</sup>. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit, erfolgt im Verlauf die Hydrolyse des GTP und damit eine Deaktivierung des G-Proteins. Eine Reassoziierung mit den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und damit eine Reaktivierung der G-Proteine durch den GPCR wird somit ermöglicht<sup>13</sup>. So entsteht durch G-Proteine ein breites Spektrum möglicher zellulärer Effekte wie unter anderem die Reorganisation des Zytoskeletts, Veränderung von Phosphorylierungszuständen und/oder Expressionsmustern, oder die Depolarisation der Zellmembran<sup>14</sup>.

#### 1.2.1.2 Subtypen und Expression

Die Subgruppe der Adrenorezeptoren kann in fünf Subtypen unterteilt werden, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und dort spezifische Wirkung haben. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die häufigsten Lokalisationen und wichtigsten Funktionen dieser Rezeptorsubtypen gegeben werden:

Subtyp	G-Protein	Organ	Funktion
$\alpha_1$	$G_q$	glatter Gefäßmuskel Herzmuskulatur	Vasokonstriktion gesteigerte Herzarbeit
$\alpha_2$	$G_i$	Präsynapse Fettgewebe	Hemmung Sympathikus Antilipolyse
$\beta_1$	$G_s$	Herzmuskulatur Niere Fettgewebe	gesteigerte Herzarbeit Reninausschüttung Lipolyse
$\beta_2$	$G_s, G_i$	Herzmuskulatur glatte Bronchialmuskulatur glatte Gefäßmuskulatur glatte Darmmuskulatur glatte Uterusmuskulatur	gesteigerte Herzarbeit Bronchodilatation Vasodilatation Senkung Darmmotilität Tokolyse
$\beta_3$	$G_s$	Herzmuskulatur Fettgewebe	u.a. gesteigerte Herzarbeit Lipolyse

**Tab. 1:** Übersicht über Lokalisation und Funktion unterschiedlicher GPCR-Subtypen im Menschen.

### 1.2.2 $\beta$ -adrenerge Signalkaskaden im Herzen

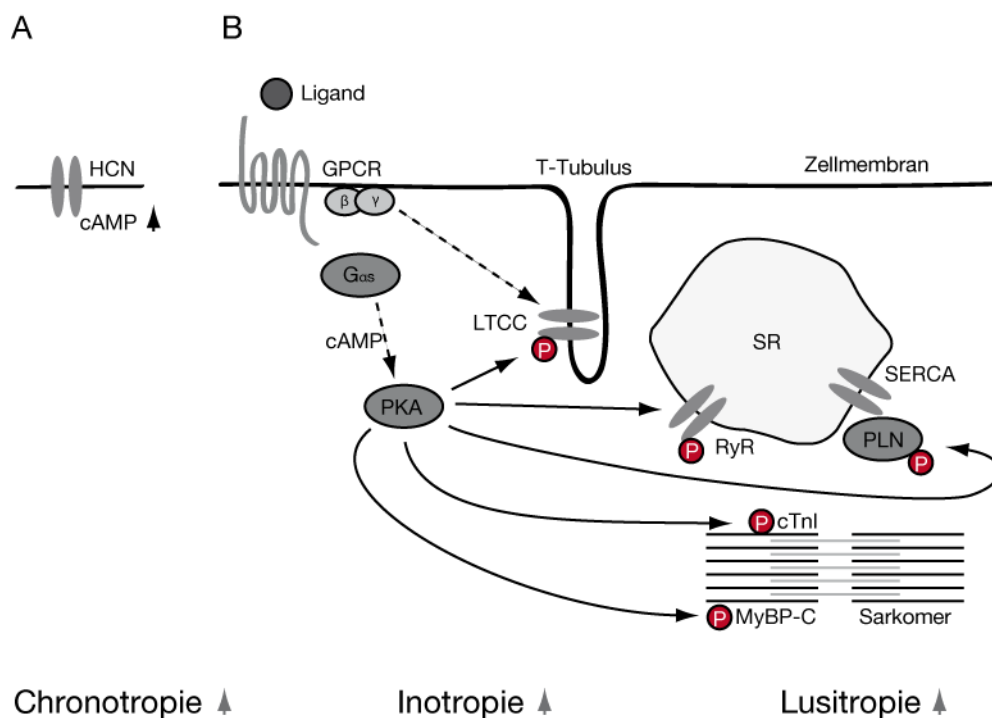
Die Anpassung der Herzarbeit an unterschiedliche Anforderungen wird maßgeblich über das autonome Nervensystem und damit folglich vor allem über  $\beta$ -adrenerge Signalwege reguliert. Sowohl akuter Sauerstoffbedarf in der Peripherie z.B. im Rahmen sportlicher Betätigung, als auch chronische kardiale Stresssituationen wie z.B. ein arterieller Hypertonus oder eine Herzinsuffizienz führen mittels Mehrausschüttung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens.

Sowohl kardiale  $\beta_1$ -, als auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren können klassische  $G_s$ -gekoppelte Signalwege modulieren: Durch  $G_s$ -abhängige Aktivierung der Adenylatzyklase kommt es intrazellulär zur gesteigerten Bildung vom cAMP, dessen primäres Zielprotein die Proteinkinase A (PKA) ist. Diese wiederum ist nun in der Lage, eine Vielzahl -für die Herzfunktion essentieller- zellulärer Zielproteine durch Phosphorylierung zu steuern:

Durch Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen (LTCC) <sup>15,16</sup> und des Ryanodinrezeptors (RyR) <sup>17</sup> kommt es zu einem verstärkten systolischen Kalziumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Eine Sensitivierung des kontraktile Apparats für Kalzium wird durch Phosphorylierung des kardialen Troponin I (cTnI) <sup>18</sup> und des Myosin-bindendem Protein-C (MyBP-C) <sup>19</sup> erreicht. Diese Modulationen führen zu einer Steigerung der Inotropie.

Der verbesserte diastolische Kalzium-Rücktransport in das SR wird durch Phosphorylierung von Phospholamban (PLN) <sup>20</sup> und damit eine verstärkte Funktion der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) bedingt. Dies führt zu einer verbesserten Relaxationsfähigkeit (Lusitropie) im Herzmuskel.

Eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels* (HCN) <sup>21</sup> in kardialen Schrittmacherzellen durch erhöhte cAMP-Level ist für eine gesteigerte Chronotropie verantwortlich.



**Abb. 1: A:** HCN-Kanal in kardialer Schrittmacherzelle;

HCN: *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*.

**B:** Schematische Übersicht über intrazelluläre, PKA-vermittelte Phosphorylierungen in Kardiomyozyten;

PKA: Proteinkinase A; LTCC: L-Typ-Kalziumkanal; RyR: Ryanodinrezeptor; PLN: Phospholamban; cTnI: kardiales Troponin I; SERCA: *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase* / Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums; MyBP-C: Myosin bindendes Protein C.

### 1.2.2.1 Die Wirkung verschiedener Rezeptorsubtypen am Herzen

Für das Herz als Organ und den Kardiomyozyten als zellulären Baustein ist die Expression von sowohl  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, als auch  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren beschrieben. Alle Rezeptorsubtypen besitzen unterschiedliche Affinität zu Ihren jeweiligen Liganden<sup>22</sup>.  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren werden in einem Verhältnis von 70:30 exprimiert und beiden Rezeptorsubtypen wird die Fähigkeit zugeschrieben, Kontraktilität und Schlagfrequenz über  $G_s$ -gekoppelte Signalwege (siehe 2.2) zu steigern<sup>23,24</sup>.

Allerdings gibt es auch drastische Unterschiede in der Funktion von kardialen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren: Mäuse, in denen kardial der  $\beta_1$ -Rezeptor überexprimiert wird, zeigen kurzfristig eine verbesserte Pumpleistung<sup>25</sup>. Allerdings entwickeln diese Tiere im Verlauf eine verstärkte Hypertrophie des Herzmuskels, erhöhte Fibrose- und Apoptoseraten und zeigen schlussendlich einen herzinsuffizienten Phänotyp<sup>26</sup>. Mechanistisch wird für eine gesteigerte Apoptoserate und ein verstärktes Auftreten von Arrhythmien eine  $\beta_1$ -abhängige Hyperphosphorylierung des RyR und diastolische Kalzium-Leckströme verantwortlich gemacht<sup>27-29</sup>.

Im Gegensatz dazu konnten für kardial  $\beta_2$ -Rezeptor-überexprimierende Mäuse bei 30-facher Überexpression eine gesteigerte Kontraktilität und geringere Apoptoseraten<sup>30</sup>, sowie in herzinsuffizienten Mäusen nach adenoviraler  $\beta_2$ -AR-Überexpression eine Verbesserung der Herzfunktion gezeigt werden<sup>31</sup>. Bei Steigerung des Expressionslevels auf die 250-fache Höhe gehen diese positiven Effekte allerdings verloren und auch hier entwickelt sich ein herzinsuffizienter Phänotyp mit verstärktem kardialen *Remodeling*<sup>32</sup>.

Da sowohl  $\beta_1$ -, als auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren klassischerweise  $G_s$ -gekoppelte Signalkaskaden auslösen, stellt sich die Frage, wie die unterschiedlichen zellulären Effekte dieser Rezeptorsubtypen zustande kommen. Hierfür werden mehrere Erklärungsansätze diskutiert.

Für  $\beta_1$ -adrenerge Signalwege ist bisher die klassische  $G_s$ -abhängige Signalkaskade bekannt, während für  $\beta_2$ -abhängige Signalwege auch eine Kopplung an  $G_i$ <sup>33,34</sup>, sowie über  $\beta$ -Arrestin vermittelte Interaktionen mit der mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK)-Kaskade als nicht-klassische Wege beschrieben sind<sup>35</sup>.

Ein zusätzlicher Ansatz zur Erklärung Rezeptorsubtyp-spezifischer Signalkaskaden ist die Theorie der Bildung von sog. Signalosomen: Die räumlich unterschiedlich ausgeprägte Expression von Rezeptoren innerhalb der Zellmembran von Kardiomyozyten



und die dazugehörige ortsabhängige Expression von distalen Bestandteilen einer Signalkaskade führt zu unterschiedlichen Effekten innerhalb der Zelle. Als Beispiel sei hier die räumlich nahe Anordnung von  $\beta_2$ -AR und RyR in den T-Tubuli von Kardiomyozyten und die daraus in dieser Region  $\beta_2$ -abhängige RyR-Hypophosphorylierung genannt<sup>36-38</sup>. Auch für sekundäre Botenstoffen wie cAMP konnten innerhalb der Zelle rezeptorabhängige, unterschiedliche Verteilungsmuster und damit auch unterschiedliche Effekte gezeigt werden<sup>39</sup>.

Für  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptoren, die sich in weitaus geringerer Zahl als  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR an der kardiomyozytären Zellmembran befinden, sind neben einer negativ-inotropen Wirkung über nicht-klassische  $G_i$ -/NO-gekoppelte Signalwege<sup>40-43</sup> auch  $G_s$ -abhängige, positiv-inotrope Effekte, beschrieben<sup>44-46</sup>. Versuche in  $\beta_3AR^{-/-}$ -Mäusen legen eine protektive Rolle dieser Rezeptorsubklasse im Herzen nahe: Diese Tiere zeigen nach chronischer Nachlasterrhöhung durch transverse Aortenkonstriktion eine verstärkte linksventrikuläre Dilatation und einen verschlechterten linksventrikulären Auswurf<sup>47</sup>. Die Wichtigkeit und genaue Funktion dieser Rezeptorsubklasse im Herzen bleibt allerdings in hohem Maße unbefriedigend geklärt und bedarf weiterer zukünftiger Erörterung.

#### 1.2.2.2 Regulationsmechanismen im Herzen

Wie in Kap. 1.2.2.1 beschrieben, verstärkt eine anhaltende, schlecht regulierte kardi-ale  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation, wie sie bei chronischer Hochdrucküberlastung durch zum Beispiel eine arterielle Hypertonie oder im Rahmen einer Herzinsuffizienz vorherrscht, das kardi-ale *Remodeling*, bedingt zudem eine Hypertrophie des Herzens und führt über längere Zeit zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz<sup>48,49</sup>. Dem Organismus stehen endo-gene Möglichkeiten zur Balancierung dieser schädigenden, anhaltend verstärkten GPCR-Signale zur Verfügung:

Zum einen kann eine direkte negative Rückkopplung im Rahmen der sog. heterolo-gen Desensibilisierung erfolgen. Diese beschreibt den Vorgang, dass eine Phosphorylie-rung des aktivierten GPCR durch eigene Effektorkinasen wie die PKC oder die PKA stattfindet. Dies hat eine Entkopplung des GPCR vom G-Protein und damit eine Unter-brechung des *Signalings* zur Folge<sup>50</sup>.

Als im Herzen maßgeblich verantwortlicher Mechanismus für die homologe Desen-sitivierung und Internalisierung von aktiven GPCRs - einem negativen Feedbackmecha-

nismus - seien an dieser Stelle G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) genannt. In Säugetieren sind in gewebeabhängiger Expression sieben unterschiedliche GRK-Isoformen beschrieben, die sich in 3 Subgruppen aufgeteilt werden<sup>51</sup>. Neben den Isoformen GRK3 und GRK6 werden im menschlichen Herzen vorrangig die Isoformen GRK2 und GRK5 exprimiert<sup>52-54</sup>. Zudem erscheint für die Isoformen GRK3 und GRK4 durch die Expression in Schilddrüsengewebe und einer Hochregulation im Rahmen einer Hyperthyreose eine kardiale Einflussnahme möglich<sup>55</sup>. Für die GRK2 und GRK3 sind eine intrazelluläre Lage und die G $\beta\gamma$ -abhängige Rekrutierung an die zytosolische Seite der Zellmembran bei Bindung von Agonisten an den GPCR beschrieben<sup>56-59</sup>.

Nach Annäherung der GRK an den GPCR erfolgt die Phosphorylierung der GPCR durch die GRK, was wiederum die Anlagerung von  $\beta$ -Arrestinen an den GPCR ermöglicht. Es ist freien G-Proteinen aus sterischen Gründen nicht mehr möglich, den GPCR zu binden<sup>60</sup>, sodass eine Unterbrechung des GPCR-abhängigen Signalwegs erfolgt. Dieser Prozess wird als homologe Desensitivierung bezeichnet. In einem weiteren Schritt kann es zusätzlich noch zur sogenannten Internalisierung des GPCR kommen: Durch die oben beschriebene Anlagerung von  $\beta$ -Arrestin an den GPCR wird dieser zum Zielmolekül für *clathrin-coated-pits*, durch welche der Rezeptor internalisiert wird. In weiteren Schritten kann der GPCR bei Bedarf entweder wieder in die Zellmembran eingebaut, oder intrazellulär degradiert werden<sup>6</sup>.

### 1.3 *Raf kinase inhibitor protein*

Das *Raf kinase inhibitor protein* (RKIP) ist Mitglied der Familie der Phosphatidylethanolamin bindenden Proteine (PEBP), deren Name ursprünglich in der Fähigkeit begründet ist, Phospholipide zu binden<sup>61</sup>. Neben Säugetieren kommt RKIP auch in Pflanzen, Hefen und Bakterien vor<sup>62</sup>.

#### 1.3.1 Expression und Struktur

In der Maus existieren fünf isoforme Gensequenzen für PEBP1 bis PEBP5 auf den Chromosomen 5, 6, 10, 12, und 19, wovon PEBP1 (im Folgenden RKIP) ubiquitär, aber stärker im Hoden und Gehirn exprimiert wird<sup>63</sup>. Die Transkription und Translation von PEBP2 findet spezifisch im Hoden statt<sup>64</sup> und PEBP4 wird nur in retinalen Ganglien-

zellen exprimiert<sup>65</sup>. Für die Gensequenzen von PEBP3 und PEBP5 gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine Erkenntnisse zu Expressionsmustern. Sie werden deshalb bisher als stille Gene bezeichnet. Die für PEBP1 (RKIP) kodierende Gensequenz befindet sich auf Chromosom 5, weist vier kodierende Exons mit einer Gesamtlänge von 1243 Basenpaaren auf und wird schlussendlich in ein Protein mit einer Länge von 187 Aminosäuren translatiert.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der für PEBP1 (RKIP) kodierenden Genequenz auf Chrom. 5;  
Kästen: Exons; Verbindungen: Introns.

Im Menschen sind nur zwei exprimierte PEBP-Isoformen bekannt: Humanes RKIP, dessen Gensequenz auf Chromosom 12 liegt, ubiquitär exprimiert wird und wie das Maus-RKIP eine Länge von 187 Aminosäuren aufweist, sowie humanes PEBP4, kodiert auf Chromosom 8, mit ebenfalls ubiquitärem Expressionsmuster und Expressions-schwerpunkt auf Tumorzellen<sup>66</sup>.

Mit einer Länge von 187 Aminosäuren hat RKIP eine geringe Molekülmasse von 21kDa und besitzt eine stark konservierte Ligandenbindungstasche für Interaktionen mit anderen Molekülen. Untersuchungen in Lösung zeigen, dass RKIP hauptsächlich aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, zwei  $\alpha$ -Helices und zwei  $3_{10}$ -Helices besteht<sup>67</sup>. Während die grundlegende Struktur von RKIP rigide ist, sind das C-terminale Ende und Bereiche der Ligandenbindungstasche -z.B. nach Phosphorylierung an Serin153- in der Lage, Konformationsänderungen einzugehen und erlauben so Interaktionen mit verschiedenen Bindungspartnern<sup>68-70</sup>.

### 1.3.2 Funktion von RKIP

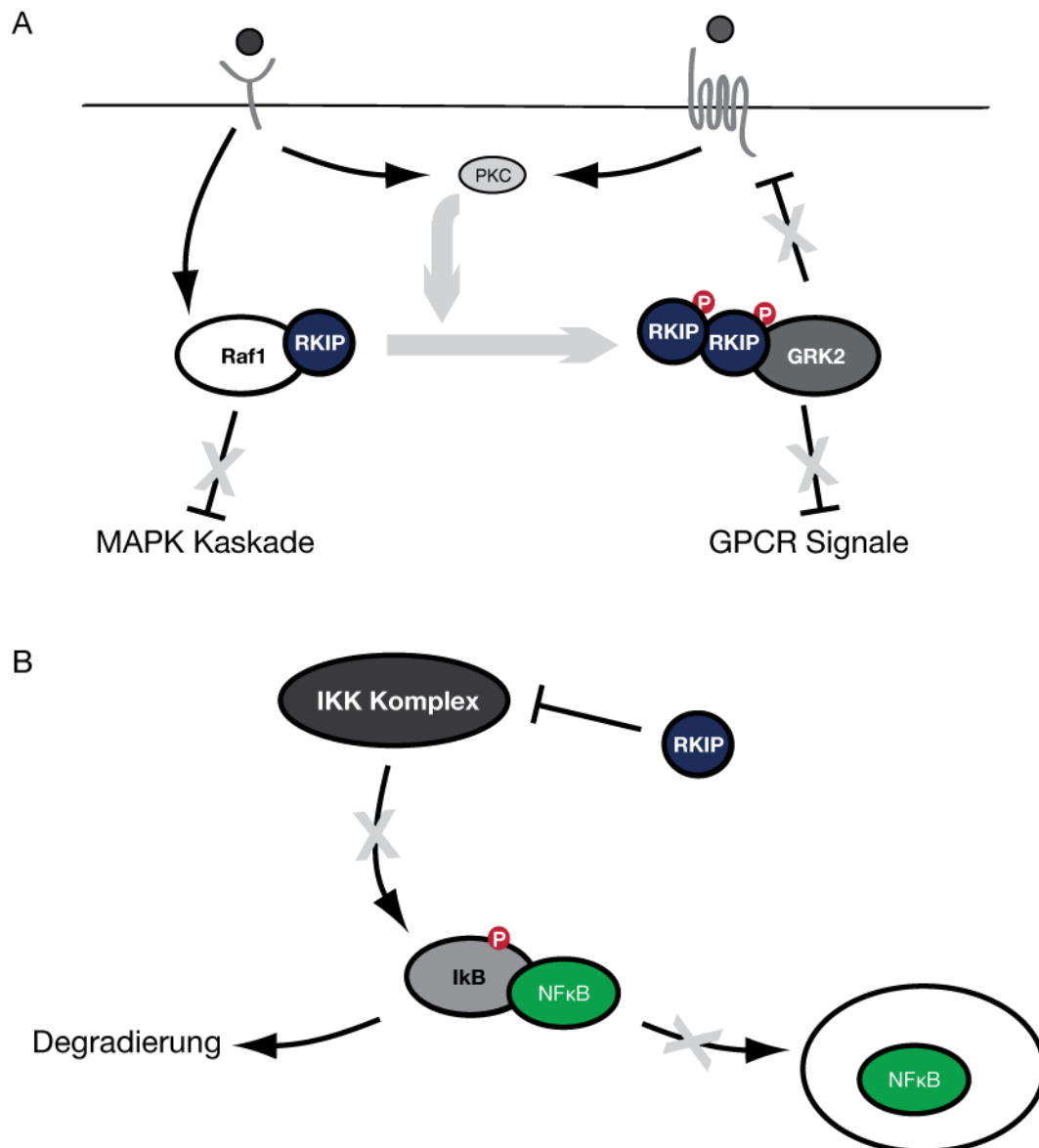
#### 1.3.2.1 Interaktion mit intrazellulären Signalwegen

RKIP gehört einer evolutionär stark konservierten Gruppe von Proteinen an, die in der Lage sind, die Signalkaskade der mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) zu modulieren. So ist RKIP in der Lage, Raf1, MEK und ERK als Bestandteile besagter Kaskade zu binden. RKIP fungiert als MAPK-Inhibitor<sup>71</sup> und nimmt durch diesen Mechanismus auch indirekten, inhibitorischen Einfluss auf die Aurora B Kinase<sup>72</sup>. Damit ist RKIP an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose, sowie der Zellzykluskontrolle beteiligt.

Yeung et. al. konnten zudem eine die inhibitorische Wirkung von RKIP auf die nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) -abhängige Transkription zeigen. Dies wird durch Inhibition der I $\kappa$ B Kinase (IKK), einem Bestandteil des durch Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  induzierten IKK-Komplex erreicht<sup>73</sup>. Dadurch beeinflusst RKIP die NF- $\kappa$ B -abhängige Produktion von Zytokinen, -rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und Apoptoseeffektoren.

RKIP ist desweiteren in der Lage, die aktive Form der Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) als Inhibitor pro-onkogener Signalwege wie *Wingless* Int1 (Wnt) oder Cyclin D1 zu stabilisieren. Dies spricht für RKIP als ein zelluläres Element zur Reduktion des Wachstums von Tumorzellen<sup>74</sup>.

Weitere wichtige Signalwege, die durch RKIP maßgeblich reguliert werden, sind intrazelluläre GPCR-Signale. Durch phosphorylierungsabhängige Inhibition der GRK2<sup>69</sup> werden GPCR-abhängige, intrazelluläre Signale verstärkt (s. Abb 3).



**Abb. 3:** **A:** Schematische Darstellung beispielhafter Interaktionen von RKIP mit Raf1 und GRK2.  
**B:** Schematische Darstellung der Hemmung Aktivität des I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplexes durch RKIP und der daraus folgenden Hemmung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nucleus.  
 Klysiak et al. 2008, modifiziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass RKIP durch phosphorylierungsabhängige Aktivitätszustände als modulierende Schnittstelle einer Vielzahl verschiedener intrazellulärer Signalwege und damit zellulärer Funktionen fungiert.

### 1.3.2.2 Organ- und krankheitsbezogene Funktion von RKIP

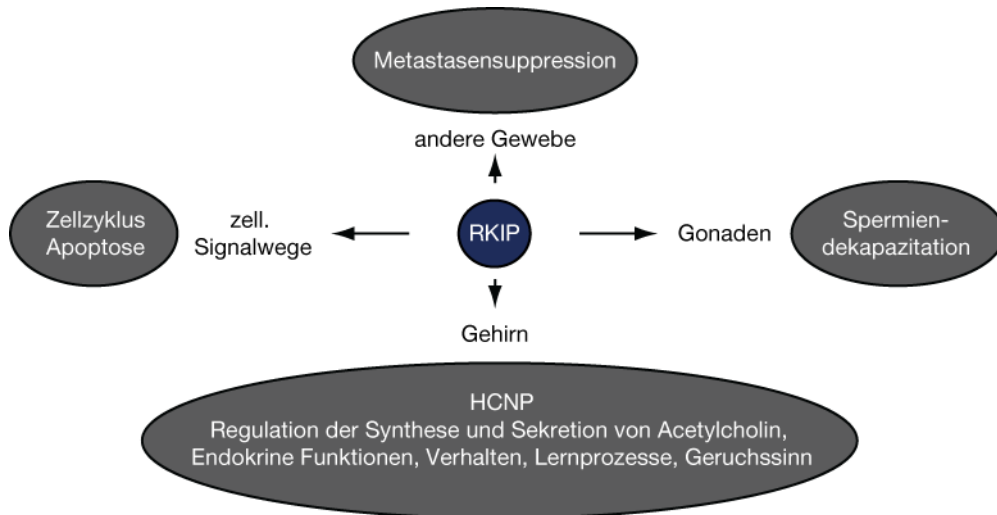
Für RKIP ist eine Vielzahl von Interaktionen mit Signalkaskaden beschrieben, die in nahezu allen Gewebetypen eine steuernde Rolle übernehmen. Dadurch besitzt RKIP modulierenden Einfluss auf zahlreiche Körperfunktionen. Hier soll in einem Ausschnitt eine kleine organ- bzw. funktionsbezogene Übersicht gegeben werden:

Die höchsten Expressionslevels für RKIP sind zerebral im Bereich des limbischen Systems und in testikulärem Gewebe zu finden. In zentralem Nervensystem (ZNS) ist RKIP unter anderem für die Ausbildung des Geruchssinns von Bedeutung. Ein Mangel von RKIP im ZNS fördert zudem Verhaltensauffälligkeiten<sup>63,75</sup>. Desweiteren ist RKIP als Vorläufer des *hippocampal cholinergic neurostimulating peptide* (HCNP) beschrieben. HCNP ist maßgeblich an der cholinergen Homöostase im ZNS beteiligt, welche im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung gestört ist. Ein Zusammenhang zwischen der zentralen Expression von RKIP und der Alzheimer-Erkrankung wird unter anderem durch Versuche in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen gestützt, in denen über vier Monate alte Tiere Lernschwierigkeiten aufweisen<sup>63</sup>.

Neben einer zentralnervösen Funktion erfüllt RKIP zudem in der Lunge, der Niere und im Hoden wichtige Funktionen:

Ein Mangel an RKIP führt in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter chronischem Sauerstoffmangel zur Entwicklung einer aggravierten pulmonal-arteriellen Hypertonie<sup>76</sup>, während RKIP in testikulärem Gewebe eine essentielle Rolle in der Reifung von Spermien während der Dekapazitation zu spielen scheint. Ein Mangel von RKIP in männlichen Mäusen hat in diesen Tieren verminderte Reproduktionsraten zur Folge<sup>77</sup>. Als Substrat der PKC wird eine Beteiligung von RKIP an der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie diskutiert<sup>78,79</sup>.

Nicht nur organbezogen, sondern auch in onkologischen Krankheitsmodellen kommt RKIP eine tragende Rolle zu: In Metastasen des Prostatakarzinoms zum Beispiel ist die Expression im Vergleich zur Expression in Zelllinien des Primarius erniedrigt<sup>80</sup>. Eine chemotherapeutische Behandlung von Prostatakrebszellen steigert in diesen die RKIP-Expression<sup>81</sup>. Eine Überexpression von RKIP in Metastasenzellen steigert zudem deren Apoptoserate und kann Invasivität durch Hemmung der Angiogenese reduzieren. So wird RKIP unter anderem als Tumorsuppressor bezeichnet<sup>71</sup>.



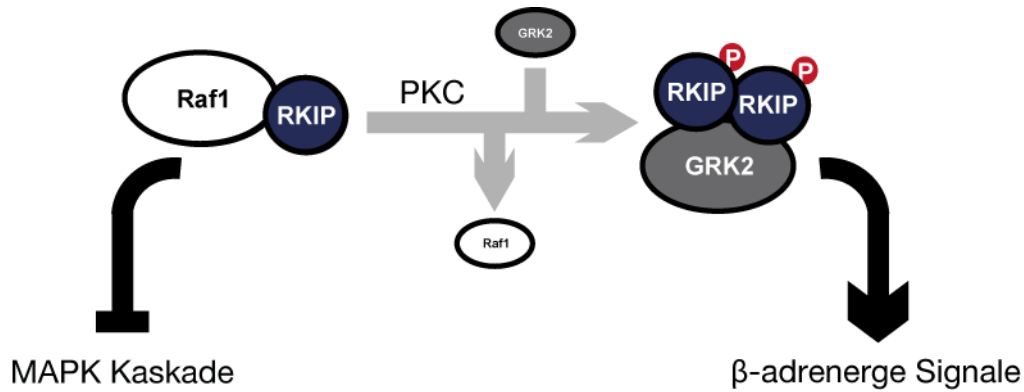
**Abb. 4:** Übersicht über die gewebeabhängige Funktion von RKIP in Säugetieren.  
Klysik et al. 2008, modifiziert.

### 1.3.2.3 Funktion im Herzen

Wie in Kap. 1.3.2.1 beschrieben, sind für RKIP als direkte Interaktionspartner Raf1, MEK und ERK2, sowie die G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase 2 (GRK2) beschrieben<sup>69,71,82</sup>. Im monomeren, unphosphorylierten Zustand bindet und inhibiert RKIP vor allem Raf1, einen Bestandteil der MAPK-Kaskade, welche eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer pathologischen kardialen Hypertrophie spielt<sup>70,71,83</sup>.

Durch Phosphorylierung an Serin153 durch die Proteinkinase C (PKC) ist RKIP in der Lage, zu dimerisieren, die GRK2 an deren N-Terminus zu binden und diese zu inhibieren<sup>68,69</sup>. Hieraus resultiert eine verminderte Rezeptordesensitivierung und – internalisierung, damit eine Verstärkung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs. Die Phosphorylierung von RKIP an Serin153 ist für die Inhibition der GRK2 notwendig. Dies konnte in Versuchen mit *human embryonic kidney* (HEK) Zellen gezeigt werden<sup>69</sup>. Auch *in vivo* konnte diese Theorie gestützt werden. Mäuse, die eine phosphorylierungsdefiziente RKIP-Mutante (RKIP<sup>S153A</sup>) aufweisen, zeigen im Gegensatz zu Mäusen, in denen RKIP kardioselektiv überexprimiert wird, keine verstärkte Hemmung der GRK2<sup>84</sup>.

An mit einem PKC-Inhibitor perfundierten Mäuseherzen konnte zudem bereits gezeigt werden, dass RKIP im Herzen vor allem phosphoryliert und damit hauptsächlich als GRK2 Inhibitor vorliegt<sup>68</sup>.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der PKC-abhängigen Phosphorylierung von RKIP und den dadurch bedingten Interaktionswechsels von Raf1 zu GRK2.  
Deiss et al., modifiziert.

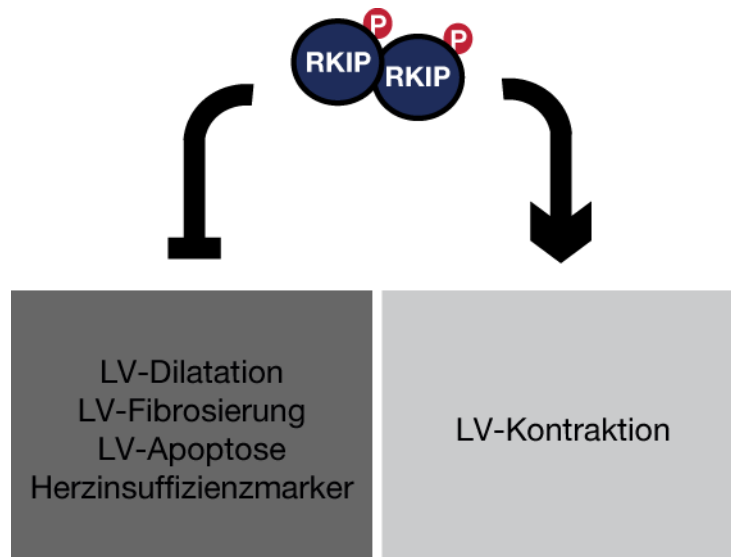
Dies legt die Vermutung nahe, dass die endogene Funktion von RKIP im Herzen hauptsächlich die eines GRK-Inhibitors ist. RKIP stellt damit einen möglichen GRK-abhängigen Angriffspunkt zur Modulation der kardialen Pumpfunktion dar.

In mehreren Modellen wurden bereits unterschiedliche Ansätze der kardialen GRK-Inhibition *in vivo* näher beschrieben. Zum einen wurde der kardiomyozytäre Knockout der GRK<sup>85</sup> untersucht, zum anderen wurde die Inhibition von GRK2 durch die herzspezifische Expression von  $\beta$ -ARKct, einem Protein, welches den C-Terminus der GRK2 und die G $\beta$ -Bindungsstelle enthält<sup>86-88</sup>, erreicht. In beiden Modellen hatten diese Formen der chronischen GRK-Inhibition deletäre Folgen.

Im Gegensatz dazu stellt sich die kardiale GRK-Inhibition durch eine kardiale Überexpression von RKIP anders dar: Wie in Abbildung 5 dargestellt, kommt es zu einem hyperkontraktilen Phänotyp in RKIP kardial überexprimierenden Mäusen (nachfolgend RKIP<sup>tg</sup>). Sowohl unter Ruhebedingungen, als auch unter chronischer Nachlastserhöhung durch dreiwöchige TAC zeigen diese Tiere eine verbesserte kardiale Pumpfunktion im Vergleich zu Wildtypmäusen (s. 6). Auch vermag eine kardiale Überexpression von RKIP die Dilatation des linken Ventrikels als Überlastungsreaktion auf eine chronischer Nachlastserhöhung signifikant zu reduzieren.



Des Weiteren hat eine kardiale RKIP-Überexpression antiapoptotische und antifibrotische Effekte und führt somit zu einer Verbesserung des kardialen *Remodeling* (s. 6): In RKIP<sup>tg</sup>-Mäusen konnten erniedrigte Expressionslevels des Herzinsuffizienzmarkers *Brain natriuretic peptide* (BNP) und eine abgeschwächte Expression von Kollagen 3 als Bestandteil von kollagenem Bindegewebe gezeigt werden. Dies gilt sowohl für zwölf Monate alte, ungestresste Mäuse, als auch für Tiere, in denen eine chronische Nachlastterhöhung durch TAC erzielt wurde.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der kardialen (LV/linksventrikulär) und systemischen Folgen einer herzspezifischen Überexpression von RKIP in Mäusen. Nach Schmid et al. 2015.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Ergebnissen zeigt sich sowohl in mit TAC behandelten Mäuseherzen, als auch in humanen Herzen von Herzinsuffizienzpatienten eine gesteigerte endogene, kardiale RKIP-Expression. Dies spricht in Zusammenschau mit den oben genannten Ergebnissen für eine Art kardialer *Rescue*-Funktion von RKIP: Eine herzspezifische RKIP-Überexpression und dadurch verursachte GRK-Inhibition schützt unter chronischem, kardialen Stress nicht nur vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, sondern führt zudem zu einer verbesserten Herzfunktion unter physiologischen Bedingungen<sup>84</sup>.

## 1. 4 Ziele dieser Arbeit

RKIP spielt im Herzen hauptsächlich als endogen vorkommender Regulator der GRK2 und damit  $\beta$ -adrenerger Signalwege eine große Rolle. Es wurde *in vitro* und *in vivo* in Mäusen mit myokardialer Überexpression von RKIP gezeigt, dass RKIP über die Hemmung der GRK-2 fähig ist, die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen zu verbessern<sup>69</sup> und negative kardiale Langzeitfolgen wie eine Verschlechterung der Insuffizienz, sowie *Remodeling*-Prozesse wie Zunahme der Fibrosierung und eine gesteigerte Apoptoserate protektiv zu beeinflussen<sup>84</sup>.

In dieser Arbeit soll deshalb die endogene kardiale Funktion von RKIP im Herzen mit Hilfe von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen näher charakterisiert werden. Es wurden homozygote RKIP<sup>-/-</sup>- Mäuse im C57/Bl6J-Hintergrund generiert, welche mit C57/Bl6J-Wildtypmäusen verglichen werden können. Durch operative Ligation des transversen Aortenbogens (TAC) wird bei diesen Tieren eine Steigerung der Nachlast von mindestens 60 mmHg verursacht, was bei chronischer Belastung eine Herzinsuffizienz zur Folge hat<sup>89</sup>. Durch verschiedene invasive und nicht-invasive Verfahren werden die Herzen in Bezug auf physiologische, morphologische und histologische Veränderungen charakterisiert.

Diese Studie soll die endogene Rolle von RKIP im Rahmen der Herzinsuffizienz erweitern und zusätzliche Informationen darüber liefern, ob mit RKIP ein interessanter körpereigener Angriffspunkt für die kontraktilitätssteigernde Therapie der Herzinsuffizienz zur Verfügung stehen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiere

Heterozygote RKIP-Knockout-Mäuse (RKIP<sup>+/-</sup>) stammen vom Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), einer Zweigstelle der University of California, Davis. Durch Einfügen eines im Folgenden gezeigten *En2-Splice-Site*-abhängigen *Gen-Trapping*-Vektors zwischen Exon 3 und 4 der RKIP-Sequenz, kommt es in diesen Tieren zum transkriptionellen Abbruch und damit zur Verhinderung der Genexpression. Durch Primerplatzierung um die Insertionsstelle des Trapping-Vektors (für Primer s. Kap. 2.1.4) werden homozygote RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse mittels PCR-Analyse detektiert. Die Zucht der RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse erfolgt in einem C57BL/6J-Hintergrund.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des für den transkriptionellen Abbruch verantwortlichen Genkonstrukts.

#### 2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
[32P]-Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid	Hartmann Analytic, Braunschweig
2, 3 Butandion-monoxim (BDM)	Sigma Aldrich, Steinheim
5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma Aldrich, Steinheim
8-(4 Chlorophenylthio)-2' O-methyladenosin- 3',5'	Biolog, Bremen
cyclic monophosphat Monohydrat Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, Steinheim

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
Benzamidin (PI)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bisindolylmaleimid I (GF 109203x)	Calbiochem
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Applichem, Darmstadt
Collagenase A	Roche Applied Science, Mannheim
Collagenase D	Roche Applied Science, Mannheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Frankfurt
Diethylcarbonat (DEPC)	Applichem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Di-Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Applichem, Darmstadt
Direct red 80	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Entwicklerlösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Applichem, Darmstadt
Eukitt®	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fixiererflüssigkeit	Sigma Aldrich, Steinheim
Forskolin	Tocris, Bristol
Fura-2-AM	Invitrogen, Frankfurt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Guanosin 5' diphosphat (GDP)	Sigma Aldrich, Steinheim
HCl, rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Isoproterenol Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ 2 (323U/mg)	Worthington, Lakewood
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma Aldrich, Steinheim

---

Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Applichem, Darmstadt
Natriumfluorid ( $\text{NaF}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Applichem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )	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
Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA)	Applichem, Darmstadt
Pikinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
ProteinmarkerIII (farbig)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
RNase-freie DNase	QIAGEN, Hilden
Roti®-Histol	Roth, Karlsruhe
Roti®-Load 1	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche Applied Science, Mannheim
Superscript (reverse Transkriptase)	Invitrogen, Frankfurt
Taurin	Sigma Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Base)	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Trypsin	PAN-Biotech, Aidenbach
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween-20	Applichem, Darmstadt
Vitamin B12	Sigma Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

---

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Chemikalien.

## 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Wirt
primär			
anti-RKIP	1:5000	eigene Herstellung (Lorenz et al., 2003)	Kaninchen
anti-RKIP	1:4000	Santa Cruz	Ziege
anti-ERK1/2	1:1000	Cell Signaling	Kaninchen
anti-pERK1/2	1:1000	Cell Signaling	Kaninchen
anti G-β	1:400	Santa Cruz	Kaninchen
sekundär			
anti-Kaninchen	1:7000	Dianova	Ziege
anti Ziege	1:7000	Dianova	Ziege

**Tabelle 3:** Liste der verwendeten Antikörper.

## 2.1.4 Oligonukleotide

Mittels Oligonukleotiden (sog. Primer) werden die Startpunkte einer Polymerase-Kettenreaktion definiert. Sie sind jeweils komplementär zur zu amplifizierenden Gensequenz und flankieren diese (for und rev). Zur genauen Darstellung der Methode s. Kap. 2.2.7.

Primer	Sequenz
RKIP for	5'-ACTATGTGCCCAAGCTGTACG-3'
RKIP rev	5'-AGCACAGCTAAGAACTCCCAA-3'
Genotyp for	5'-GCTTTCCAGGCCTCTCAGTGTTTCATCAG-3'
Genotyp rev	5'-CCCGCCCATCCTGCCCATAGG-3'
GAPDH for	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3'
GAPDH rev	5'-CATTATCGGCCTTGACTGTG-3'
BNP for	5'-GGATCGGATCCGTCAGTCGTT-3'
BNP rev	5'-AGACCCAGGCAGAGTCAGAAA-3'
ANP for	5'-ACAGATCTGATGGATTTCAAGAACCTG-3'
ANP rev	5'-AGTGCGGCCCTGCTTCCTCA-3'
Kollagen 3a for	5'-AAACAGCAAATTCACCTTACAC-3'

Kollagen 3a rev

5'-ACCCCCAATGTCATAGG-3'

**Tabelle 4:** Liste der verwendeten Primersequenzen.

## 2.1.5 Pufferliste

Puffer		
10x IBX:	NaF	500mM
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	50mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10mM
	NaN <sub>3</sub>	0,02% (MIV)
100x Protease Inhibitor:	Trypsininhibitor aus der Sojabohne	1mg/ml
	Benzamidin	1,5mg/ml
	in 50mM Tris pH 7,4	
PMSF:	PMSF	100mM
	In absolutem Ethanol	
2xTSE-Puffer:	Tris	100mM
	NaCl	600mM
	EDTA	10mM
	NaN <sub>3</sub>	0,02% (MIV)
	pH 7,4 (HCl)	
Lysepuffer:	1xIBX	
	1xTSE	
	Triton X	1% (VIV)
	PMSF	1mM
	1xPI	
10xSDS:	Tris	250mM
	Glycin	1,92M
	SDS	0,10% (VIV)
Transferpuffer:	Methanol	20% (VIV)
	Tris	20mM
	Glycin	150mM
BSA-Waschpuffer:	Bovines Serum Albumin	0,25% (MIV)

	NaCl	150mM
	Tris pH 7,6	50mM
	Nonident P40	0,20% (VIV)
Magermilchlösung:	Magermichpulver	5% (MIV)
	Tris pH7,6	10mM
	Tween 20	0,10% (VIV)
10x PBS:	NaCl	1,37 M
	KCl	27mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,1mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM
PFA (4%):	Paraformaldehyd in 1xPBS	750mM
Perfusionspuffer:	NaCl	120mM
	KCl	15mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6mM
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1,2mM
	NaHEPES	10mM
	NaHCO <sub>3</sub>	4,6mM
	Taurine	30mM
	BDM	10mM
	Glucose	5,5mM
	pH 7,3-7,4 (NaOH)	
Verdaupuffer:	1xPerfusionspuffer	
	Trypsin	0,03% (MIV)
	Kollagenase A	0,7mg/ml
	Kollagenase D	2,1mg/ml
	CaCl <sub>2</sub>	12,5µM
Stoppuffer:	1xPerfusionspuffer	
	FCS	10% (VIV)
	CaCl <sub>2</sub>	12,5µM
Messpuffer:	NaCl	137mM
	KCl	5,4mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,0/1,2mM



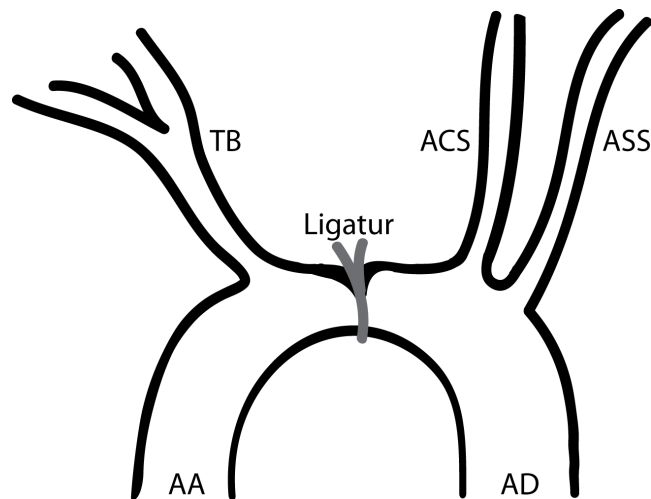
	MgCl <sub>2</sub>	1mM
	HEPES	10mM
	Glucose	5,5mM
	pH 7,3-7,4 (NaOH)	
SAP-Puffer:	Tris	50mM
	MgCl <sub>2</sub>	10mM
	pH 8,5(HCl)	
Homogenisierungspuffer:	Tris	50mM
	MgCl <sub>2</sub>	5mM
	EDTA	5mM
	EGTA	1mM
	Aprotinin	1µg/ml
Trägerflüssigkeit:	HEPES (pH 7.4)	20mM
	EDTA	2mM
	MgCl <sub>2</sub>	10mM

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten Pufferlösungen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transverse Aortenkonstriktion

Um eine chronische Erhöhung der Nachlast von mind. 60 mm Hg zu erreichen, wird das Prinzip der sogenannten transversen Aortenkonstriktion angewandt<sup>90</sup>. Die Operation der Mäuse findet im Alter von 8 Wochen unter operationsmikroskopischer Kontrolle statt. Es erfolgt die Konstriktion der Aorta zwischen den aortalen Abgängen *Truncus brachiocephalicus* und *Arteria carotis sinistra*. Hierfür wird eine Nadel mit einer Dicke von 27 Gauge (0,40 mm) auf das Gefäß gelegt. Anschließend wird die Aorta inklusive Nadel mit einem Seidenfaden (6.0 Prolene) umschlungen und ligiert. Somit wird eine reproduzierbare Einengung der Aorta auf den Durchmesser der Nadel erzielt<sup>91</sup>. Ausschlusskriterium ist ein Druckgradient über der Ligatur von unter 60 mmHg. Die hier beschriebene Operation wird von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt.



**Abb. 8:** Schema der operativen Ligatur des Aortenbogens, transverse Aortenkonstriktion;  
AA: *Aorta ascendens*; AD: *Aorta descendens*; TB: *Truncus brachiocephalicus*;  
ACS: *Arteria carotis sinistra*; ASS: *Arteria subclavia sinistra*;

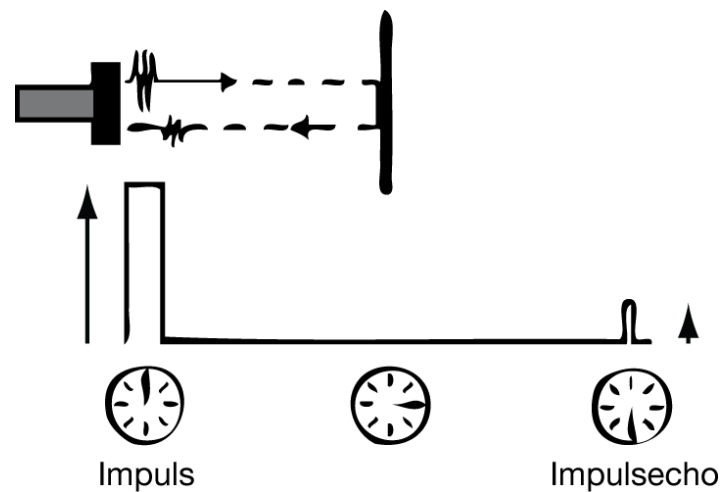
## 2.2.2 Echokardiographie

Um die Pumpfunktion der Mäuseherzen *in vivo* näher beschreiben zu können, wurden die Tiere unter Ruhe- sowie unter chronischen Hochdruckbedingungen echokardiografisch untersucht.

### 2.2.2.1 Funktionsweise

Die Ultraschalluntersuchung kann Gewebe durch das sogenannte Impuls-Echo-Verfahren darstellen. Der Schallkopf produziert und entsendet mit Hilfe von in ihm angeordneten Kristallen Ultraschallwellen (piezoelektrischer Effekt) mit einer Wellenlänge zwischen 1 und 40 Mhz. Durch Widerstandsunterschiede zwischen Geweben unterschiedlicher Zusammensetzungen kommt es zur Reflexion des Ultraschalls und der reflektierte Schall wird von der Sonde in unterschiedlicher Zeit und Intensität wieder empfangen. Unterschiedlich starke Reflexion (Echogenität) kann in verschiedenen Graustufen umgerechnet werden. Laufzeitunterschiede stellen die Eindringtiefe dar. Somit ist eine Orts-, als auch Zusammensetzungsauflösung möglich. Die Qualität der Ortsauflösung, also die Nähe zwischen zwei nebeneinander dargestellten Punkten ist direkt proportional zur Impulswiederholungsfrequenz. Die Eindringtiefe verhält sich umgekehrt proportional zur Frequenz. Das verwendete System entsendet Ultraschall-

wellen mit einer Frequenz von 30 Mhz. Das Schema in Abbildung 9 veranschaulicht das Prinzip der Laufzeit- und Echogenitätsmessung.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Laufzeit- und Echogenitätsmessung; Laufzeiten werden in der horizontalen Zeitachse vom Zeitpunkt der Impulsaussendung bis zum Empfang des Impulsecho gemessen; Echogenität (Stärke des empfangenen Echos) wird in der vertikalen Achse (Pfeile) gemessen.

Alfaomega 2008, modifiziert.

#### 2.2.2.2 Darstellungsmethoden

Im M-Mode (m für *motion*), lässt sich die Amplitude des Ultraschallsignals vertikal, und die Zeit horizontal gegeneinander darstellen. Somit ist eine zweidimensionale Untersuchung von Gewebe und damit eine Darstellung von Bewegungsabläufen möglich.

Mit Hilfe des Doppler-Verfahrens, welches darauf beruht, dass das von Erythrozyten reflektierte Ultraschallecho durch die Bewegung des Blutes um eine bestimmte Frequenz (Doppler-Frequenz) verschiebt, lassen sich Blutflussgeschwindigkeiten und die Flussrichtung messen und darstellen.

#### 2.2.2.3 Untersuchungsablauf

Die untersuchten Mäuse werden für die Ultraschalluntersuchung mit einer intraperitonealen Phenobarbitalgabe von 35 mg/kg KG anästhesiert. Nach Fixierung auf einem schwenkbaren und beheizbaren (42°C) Untersuchungstisch erfolgt die transthorakale Echokardiographie (Vevo2100, VisualSonics), mit einem 30 Mhz-Schallkopf (RMV-707B). Im M-Mode können auf Höhe der proximalen Papillarmuskeln in der kurzen

Achse, also parallel zur Klappenebene des linken Ventrikels der endsystolische, als auch der enddiastolische innere Durchmesser (LVIDES und LVIDED), sowie die ventrikuläre Septumdicke und die Hinterwanddicke des linken Ventrikels ermittelt werden. Zum Einen ist es dadurch möglich, über Septum- und Hinterwanddicke Aussagen zur Hypertrophie des Myokards zu machen, zum anderen kann eine Dilatation des linken Ventrikels quantifiziert werden.

Zudem ist es möglich, die Verkürzungsfraction als physiologischen Parameter für die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels wie folgt mit Hilfe der im Gerät integrierten Software von VisualSonics zu berechnen:

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

Um einen Aufschluss über den Grad der durch TAC hervorgerufene Stenose des Aortenbogens zu erhalten, wurde die Flussgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) über dem Ausflusstrakt mit Hilfe einer Doppleruntersuchung beurteilt (s. Kap. 2.2.1). Aus den gemessenen Flussgeschwindigkeiten werden die Druckgradienten über der künstlichen Stenose errechnet:

$$\text{Druckgradient} = 4 \times (V_{\max} / 1,000)^2$$

Der hier beschriebene Versuch wurde von Prof. Dr. Kristina Lorenz durchgeführt.

### 2.2.3 Organentnahmen

Um kardiales Gewebe zu gewinnen, erfolgt die Tötung zu untersuchenden Tiere mit anschließender Organentnahme. Nach der Tötung der Maus mittels Genickbruch wird diese gewogen (*body weight*, BW). Nach zügiger Thorakotomie und stumpfer Präparation der kardialen Kavität wird das Herz entnommen, die großen Gefäße herznah abgesetzt und die Herzohren beidseits mit der Schere abpräpariert. Nach Ausstreichen des durch Rückstau noch in den Herzhöhlen befindlichen Bluts wird auch das Herz gewogen (*heart weight*, HW). Es erfolgt eine scharfe Teilung des Gewebes auf Papillarmuskelebene. Die apikale Hälfte wird für histologische und morphologische Untersuchun-

gen in 4%-igem Formalin fixiert. Das kaudale Gewebe wird bis zur Weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4 Histologische und morphologische Untersuchungen, TUNEL-Assays

Für die Analyse des Herzmuskelgewebes werden im Anschluss an die Organentnahme repräsentative Querschnitte auf Ventrikelenebene angefertigt, anschließend einer SiriusRot®, HE- und TUNEL®-Färbung unterzogen und im letzten Schritt untersucht.

##### 2.2.4.1 Erstellung von Gewebeschnitten

Die Herstellung von Gewebeschnitten wird durch das Pathologische Institut der Universität Würzburg durchgeführt. Nach Organentnahme werden die Herzen in 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol als Zwischenmedium getränkt und schlussendlich in verflüssigtem Paraffin eingebettet. Nach Gießen des Gewebes in der Apparatur EG1150H der Firma Leica kann dieses mit Hilfe eines Mikrotoms in Schichten von 2µm Dicke geschnitten und nach abschließender Trocknung über Nacht bei 45°C die gewünschten Färbungen angefertigt werden.

##### 2.2.4.2 SiriusRot®-Färbung

Bei SiriusRot® handelt es sich um einen anionischen Farbstoff, welcher durch Bindung an die stark basischen Bestandteile des Kollagenmoleküls diese anfärbt und daher für die Quantifizierung der Fibrose des linken Ventrikels genutzt wird. Nach Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgt die Färbung in SiriusRot®-Färbelösung, wie durch Schmid et al. beschrieben<sup>84</sup>.

##### 2.2.4.3 HE-Färbung

Um Aussagen zur Zellgröße machen zu können, werden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) von linksventrikulären Querschnitten angefertigt. Das enthaltene Hämatoxylin färbt als stark basischer Bestandteil die in der Probe enthaltenen basophilen

Strukturen (v.a. Zellkerne) blau. Eosin färbt als synthetischer, saurer Farbstoff die azidophilen Zellbestandteile (v.a. den Intrazellularraum) rot.

Auch hier erfolgt zunächst eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Im Anschluss kann die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wie beschrieben stattfinden<sup>84</sup>.

Die in Kap. 2.2.4.2 bis Kap. 2.2.4.3 beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch die technische Assistentin Marianne Babl ausgeführt.

#### 2.2.4.4 TUNEL-Färbung

Um Aussagen zur Apoptose in Kardiomyozyten des linken Ventrikels treffen zu können, werden Ventrikelquerschnitte mit Hilfe des Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling Assays (TUNEL) eingefärbt. Während der Apoptose von Zellen kommt es durch apoptotische Signalkaskaden (s. Einleitung) zur Fragmentierung von DNA. Die dadurch in den DNA-Strängen entstehenden Knicke, bzw. freie 3'-OH-Gruppen können durch das Enzym terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) identifiziert und an diesen Stellen das Einsetzen von an fluorescein gebundenen dUTPs katalysiert werden.

Um den Assay durchführen zu können, müssen die wie in Kap. 2.2.4.1 erstellten, 2µm dicken Gewebeschnitte entwacht und rehydriert werden. Im Anschluss wird das Gewebe mit Proteinase K (AppliChem) durchgängig gemacht und mit RNase behandelt. Die TUNEL-Färbung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers (The In Situ Cell Death Detection Kit, Roche). Zusätzlich zu den zu untersuchenden Querschnitten erfolgt bei jedem Durchgang des Assays eine Positiv- und Negativkontrolle. Hierfür wird jeweils ein Gewebeschnitt mit DNase I (Sigma) vorbehandelt (Positivkontrolle). Bei einem anderen wird die für die TUNEL-Reaktion notwendige TdT nicht appliziert. Zur Differenzierung zwischen physiologischen und apoptotischen Zellkernen erfolgt eine Gegenfärbung dieser mit Hoechst33258-Färbung (Sigma), sowie eine Färbung der Zellmembranen mit Weizenkeim-Agglutinin. Im Anschluss an das Färbeprocédere können nach Waschung die apoptotischen Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 4000B, HCX PL Fluotar Objektive (1.25× und 40×), JVC KY-F75U Kamera, GFP-ET, A und N2.1 Filter) sichtbar gemacht und schlussendlich nach Verblindung quantifiziert werden.

#### 2.2.4.5 Auswertung histologischer Querschnitte

Für die Auswertung der histologischen Färbungen werden die Ventrikelquerschnitte in 1,25-facher Vergrößerung digital abfotografiert und anschließend für die spätere Auswertung verblindet. Um quantitative Aussagen zu den Färbungen treffen zu können, wird als Software Adobe Photoshop CS4 verwendet.

Zur Auswertung der SiriusRot®-Färbung werden im ersten Schritt Areale, die nicht Bestandteil des linken Ventrikels sind, manuell durch den Untersucher markiert und im Anschluss mittels Histogrammfunktion und einer Toleranzbreite von 25 quantifiziert. Somit ist nach Subtraktion dieser Pixelzahl von der Gesamtpixelzahl des Bildes die Größe des linken Ventrikels erfasst. Um die fibrotischen Veränderungen zu erfassen, wird ein der SiriusRot®-Färbung entsprechender Rotton festgelegt und auch dieser daraufhin mittels *Color-Range*-Auswahlfunktion und einer Toleranzbreite von 160 in Pixeln quantifiziert. Nun kann der Grad der Fibrose als Prozentsatz des Querschnitts des linken Ventrikels angegeben werden.

Zur Auswertung der mit HE gefärbten Schnitte werden pro Tier zwischen 29 und 79 repräsentative Zellen (sichtbarer Zellkern im Querschnitt, klare Zellgrenzen) mittels Auswahlwerkzeug umrandet, die Zellfläche in Pixeln ausgemessen und die Werte im Anschluss gemittelt.

#### 2.2.5 Analyse von Proteinexpressionen

Um Aussagen zur endogenen Expression von RKIP im Herzen machen zu können, werden diese Expressionslevels auf Proteinebene untersucht.

##### 2.2.5.1 Herstellung von Herzlysaten

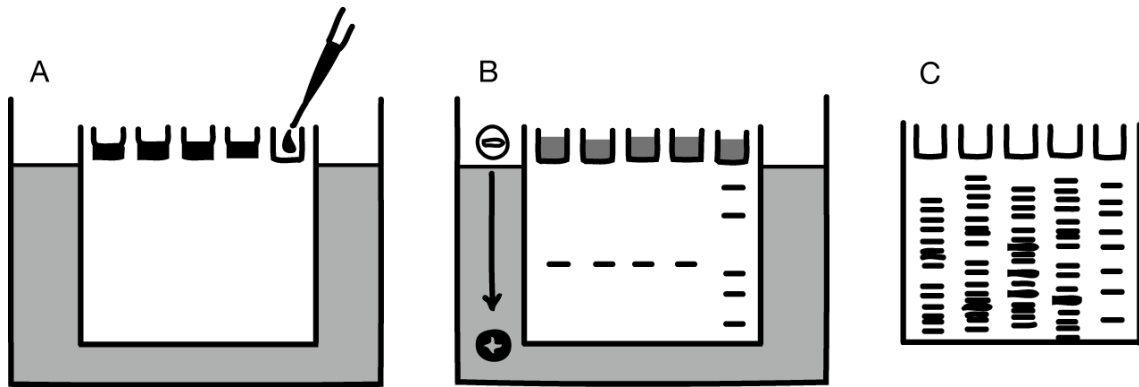
Nach der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Organentnahme kann das kaudale Gewebe des linken Ventrikels zur Herstellung von Gewebelysaten verwendet werden. Im Ersten Schritt werden die Gewebeproben mittels Ultra-Thurrax® T25 (IKA Labortechnik) in *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) zerkleinert. Anschließend erfolgt die Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes in einem Lysepuffer (s. Tabelle 4) unter Zugabe der Proteaseinhibitoren Aprotinin und PMSF. Danach schließt sich ein Zentrifugationsschritt über 10 Minuten bei 4°C und 1000g zur Abtrennung von Zelltrümmern und die

Überführung des Überstands, in dem die löslichen Proteine enthalten sind, in ein neues Gefäß an. Es kann nun die Analyse der Proteinkonzentration im Überstand mittels BCA-Methode (Thermo Scientific) stattfinden. Diese Methode basiert auf der Analyse eines Farbumschlags, der sich durch die Komplexbildung von Bicinchoninsäure (BCA) mit einwertigen Kuper-Ionen ( $\text{Cu}^+$ ) ergibt<sup>92</sup>. Da diese einwertigen Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung aus  $\text{Cu}^{2+}$ -Protein-Komplexen entstehen, die im Überstand enthalten sind, korreliert der Farbumschlag mit der in der Lösung enthaltenen Proteinkonzentration. Mittels einer Standardverdünnungsreihe aus in Wasser gelöstem bovinem Serumalbumin (BSA) und einer Leerprobe aus reinem Wasser erfolgt im Anschluss in Triplets die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten: 25  $\mu\text{l}$  Überstand werden mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz für 25 Minuten inkubiert und schlussendlich die Absorption bei 562nm in einem SpectraMax 340 (Molecular Devices) gemessen.

#### 2.2.5.2 SDS-Page

Um Proteingemische der Größe nach auftrennen zu können, wird die sogenannte *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) verwendet. Da hierfür ein elektrisch angelegtes Feld mit Anode und Kathode genutzt wird, müssen zunächst alle Proteine denaturiert und die Eigenladungen der Aminoreste einheitlich negativ überdeckt sein. Dafür zeichnet sich Natriumaurylsulfat (SDS) verantwortlich, welches sowohl im Gel, in welchem die Proteine sich Richtung Anode bewegen, als auch im Lade- und Laufpuffer enthalten ist. Acrylamid ist zum einen Grundbaustein der Gelmatrix, zum anderen ist der prozentuale Acrylamidanteil umgekehrt proportional zur Porengröße des Gels. Das Gel besteht aus zwei strukturellen Abschnitten: Ein Sammelgel mit 4% Acrylamid, in dem sich die Proteine zu einer scharfen Lauffront ansammeln und ein Trenngel mit zwischen 6% und 15% Acrylamid, in welchem sich die Proteine auf dem Weg zur Anode nach ihrer Größe auftrennen. Die Gele werden in mit Laufpuffer (1-fach SDS) gefüllte Kammern (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, BioRad) platziert und anschließend mit den Proteinproben beladen. Schlussendlich erfolgt die Proteinauftrennung über ungefähr eine Stunde bei einer angelegten Spannung von 200V. In Abbildung 10 ist schematisch der Ablauf einer SDS-Page dargestellt.





**Abb. 10:** Schematische Darstellung des SDS-PAGE; hellgrau: Laufpuffer; dunkelgrau: Ladebuffer;  
**A:** Beladen der Geltaschen mit zu untersuchendem Protein (schwarz) und Proteinmarker (Tropfen);  
**B:** Auftrennung der Proteine im vertikal angelegten elektrischen Feld;  
**C:** Aufgetrennte Proteinbanden im Gel;  
 SigmaAldrich, modifiziert.

### 2.2.5.3 Proteintransfer

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden nun mittels „Wet“-Blot-Verfahren (Mini Trans-Blot Cell, BioRad) auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond TM-P; 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße) übertragen. Auch hierfür wird wieder ein elektrisches Feld (Spannung von 100V) angelegt. Allerdings sind die Anode und Kathode in diesem Fall so ausgerichtet, dass sich die noch immer negativ geladenen Proteine nicht im Gel, sondern vertikal aus dem Gel in die darüber platzierte PVDF-Membran bewegen. Das System ist hierfür mit Transferpuffer (s. Kap. 2.1.5) gefüllt und wird für die Dauer des Transfers (80 Minuten) gekühlt.

### 2.2.5.4 Immunodetektion

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteinbanden können nun spezifisch mittels Immunodetektion, also mit spezifisch an die zu untersuchenden Proteine bindenden Antikörpern sichtbar gemacht werden. Um unspezifische Interaktionen mit der Membran und damit undeutliche Signale zu verhindern, wird diese über 120 Minuten mit Hilfe einer 5%-igen Magermilchlösung (s. Kap. 2.1.5) aufgesättigt. Es folgt dann die Inkubation der Membran mit dem spezifisch an das gewünschte Protein bindenden Primärantikörper bei 4°C für zirka 12 Stunden. Im Anschluss folgt das Waschen der

Membran zur Beseitigung des überschüssigen Antikörpers in fünf Schritten für jeweils mindestens zehn Minuten in BSA-Puffer (s. Kap. 2.1.5).

Nach Verdünnung in BSA Puffer in gewünschtem Verhältnis schließt sich die zweistündige Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper an. Dieser bindet mit seiner Fab-Einheit zum Einen an die Fc-Einheit des Primärantikörpers, zum Anderen ist an die Fc-Einheit des Sekundärantikörpers eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, durch welche mittels Chemilumineszenz-Reaktion die Belichtung eines auf die Membran gelegten Röntgenfilms (Super RX, Fujifilm) möglich ist. Substrat für die Peroxidase ist das Amersham ECL Plus TM Western Blotting Detection Reagent. Schlussendlich werden die Immunoblotsignale auf dem Röntgenfilm mit Adobe Photoshop CS4 quantifiziert.

## 2.2.6 GRK2-Aktivität

### 2.2.6.1 Phosphorylierungsassays

Da RKIP im Herzen vor allem phosphoryliert und damit als funktioneller GRK2-Inhibitor vorliegt <sup>68</sup>, soll die Aktivität von GRK2 in kardialen Geweben von Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren untersucht werden. Um Aussagen über die Aktivität der GRK2 machen zu können, wird sich deren Fähigkeit zu Nutze gemacht, *in vitro* die G $\beta$  $\gamma$ -vermittelte Phosphorylierung von Rhodopsin inhibieren zu können <sup>93</sup>. Im Versuch wird Rhodopsin in den Segmentmembranen von mit Harnstoff vorbehandelten, retinalen Stäbchenzellen zur Verfügung gestellt <sup>84</sup>.

Nach Aktivierung der Rhodopsinsignalkaskade durch eine Lichtquelle und die G $\beta$  $\gamma$ -vermittelte Phosphorylierung mit hinzugefügten  $\gamma$ -32-Phospho-ATP erfolgt im nächsten Arbeitsschritt die Isolierung von radioaktivem, phosphoryliertem Rhodopsin mittels SDS-Page (für Methode s. Kap. 2.2.5.1). Schlussendlich schließt sich die Auswertung der isolierten Signale mittels Autoradiographie und eine Quantifizierung mit Hilfe eines PhosphorImagers an. Der hier beschriebene Versuch wurde durch Frau Dr. Katharina Deiss ausgeführt.

### 2.2.7 Analyse von Genexpressionen

Um einen mehrdimensionalen Einblick in die Fibrosierung und Herzinsuffizienz der basalen und mit chronischem Hochdruck überlasteten Mäuseherzen zu gewinnen, wurde neben Färbemethoden und Ultraschalluntersuchungen die quantitative Polymerasekettenreaktion (*realtime* PCR) genutzt. Mit der *realtime* PCR ist eine Quantifizierung der mRNAs bestimmter Gene möglich. mRNAs werden während der Transkription, einem nötigen Zwischenschritt in der Expression von Genen gebildet, und stellen somit ein direktes Äquivalent für die Expressionsaktivität bestimmter Gene dar.

#### 2.2.7.1 RNA-Präparation

Zur Präparation der mRNA wird das RNeasy Midi Kit der Firma Qiagen genutzt und im Vorfeld alle verwendeten Arbeitsmaterialien durch RNase-Zap® von RNAsen befreit. Um alle im Herzgewebe vorhandenen RNAsen zu deaktivieren, wird die Lyse in stark denaturierendem Puffer durchgeführt. Um das durch den kontraktilem Apparat sehr proteinreiche Gewebe des Herzmuskels adäquat aufzubereiten, wird ein weiterer Verdauungsschritt mit Proteinase K durchgeführt. Um ideale Bindungsvoraussetzungen zu gewährleisten, wird eine Fällung der Nukleinsäuren RNA und DNA durch die Zugabe von Ethanol zum salzhaltigen Puffer durchgeführt. Anschließend werden mit RNeasy-Silica-Membran bestückte Säulen mit diesem Lysat beladen. An diesen Membranen bindet nur RNA, welche eine Länge von über 200 Nukleotiden aufweist. Dadurch werden alle kürzeren RNA-Formen wie z.B. t-RNA bei Reinigungsschritten mit Ethanol abgewaschen. Durch Verdau mit RNase-freier DNase wird verunreinigende, lange, genomische DNA verkürzt und ebenfalls abgewaschen. Aufgereinigte, konzentrierte RNA wird dann mit RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend bis zur reversen Transkription bei -80°C gelagert.

#### 2.2.7.2 Reverse Transkription

Neben mRNA ist in den aufgereinigten RNA-Proben auch eine Vielzahl anderer RNA-Subtypen, wie z.B. ribosomale RNA enthalten. Zur Umschreibung von RNA in einzelsträngige, komplementäre cDNA wird eine retrovirale reverse Transkriptase genutzt. Wie alle Polymerasen schreibt auch die reverse Transkriptase die cDNA in 3'-

Richtung und benötigt einen zur mRNA spezifischen, komplementären *Primer* als Startpunkt. Da dieser oligo dt-*Primer* so gewählt wird, dass er an den nur in mRNA am 3'-Ende vorhandenen Poly-A-Schwanz bindet, wird ausschließlich mRNA in cDNA umgeschrieben. Da dies im Verhältnis 1:1 geschieht, ist die Quantifizierung der cDNA äquivalent zur mRNA.

Um eine falsch-positive Messungen von z.B. genomischer DNA in der *realtime* PCR ausschließen zu können, wird zum Einen in einer Probe auf die Zugabe reverser Transkriptase verzichtet und diese Probe als Negativkontrolle verwendet. Zum Anderen werden die PCR-Primer so gewählt, dass sie in genomischer DNA noch vorhandene Introns überspannen und durch eine zu große Länge des zwischenliegenden Abschnitts dieser nicht mehr amplifizierbar ist. Aus vier willkürlichen Proben wird zusätzlich eine Standardreihe erstellt.

Nach Messung der RNA-Konzentration am Nanodrop der Firma Peqlab wurde für die reverse Transkription in cDNA 1µg RNA eingesetzt. Diese wird mit dem Superscript™-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt: Es erfolgt eine 10 minütige Erhitzung der RNA gemeinsam mit oligo dt-Primern (Endkonzentration: 1µM) und den dNTPs (Endkonzentration: 0,5mM) auf 70°C, um doppelsträngige DNA zu denaturieren und das Binden der oligo dt-Primer zu gewährleisten. Die reverse Transkription erfolgt für 60min bei 42°C nach Zugabe von 5xPuffer, DTT (Endkonzentration: 10mM), RNAsin (RNase-Inhibitor der Firma OMEGA) und der reversen Transkriptase. In der Negativkontrolle wird auf eine Zugabe der reversen Transkriptase verzichtet. Anschließend wird die reverse Transkriptase bei 70°C für 15min inaktiviert. Die gewonnene cDNA wird 1:12,5 mit DEPC-Wasser verdünnt.

### 2.2.7.3 *Realtime* PCR

Durch die Auswahl spezifischer, komplementärer Primer wird der zu amplifizierende DNA-Bereich bestimmt. Im Gegensatz zur kompetitiven PCR wird nicht erst nach Ablauf der PCR eine Quantifizierung der Fragmente vorgenommen, sondern nach jedem Zyklus die Fluoreszenz der eingesetzten Probe gemessen. Hierfür wird jeder Probe ein mit doppelsträngiger DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen zugesetzt. Mit der Anzahl der umgeschriebenen PCR-Fragmente verdoppelt sich im Idealfall mit jedem Zyklus auch die Fluoreszenz der Probe. Die zum Überschreiten der Hintergrund-

fluoreszenz benötigte Zykluszahl wird *threshold cycle* ( $C_T$ ) genannt. Für weniger exprimierte Gene, deren mRNA, bzw. cDNA in geringerer Menge vorliegt, werden mehr Zyklen zum Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz benötigt, als für stärker exprimierte Gene. Um einen Pipettierfehler und unterschiedlich eingesetzte cDNA-Mengen auszugleichen, werden die untersuchten cDNA-Konzentrationen immer im Verhältnis zu einem Referenzwert (sogenannten *housekeeping* Genen) angegeben. Hierbei handelt es sich um Gene, die in Zellen konstant und stark exprimiert werden. In diesem Fall dient die cDNA der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein in der Glykolyse benötigtes Enzym, als Referenzwert. Für die *realtime* PCR wird der 2xSupermix SsoFast™ EvaGreen (Biorad) benutzt, der aus dNTPs, eine DNA-Polymerase und das Fluorophor in einer gepufferten Lösung besteht. In einer 384-Well-Platte werden jeweils 2,5 µl der cDNA (entspricht 10ng der Ursprungs-RNA), der vier Standards, der Negativkontrolle und eines Leerwerts (DEPC-Wasser) vorgelegt und anschließend die Primer (480nM) inkl. Supermix hinzugefügt. Die PCR wird anschließend im Thermocycler C1000 der Firma Biorad mit dem folgenden Programm durchgeführt:

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

Zur Bestimmung der Schmelzkurve wird 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. Dadurch kann mit der Schmelzkurve am Ende der PCR überprüft werden, ob die Fluoreszenzkurve das Resultat nur eines oder mehrerer PCR-Produkte ist.

Die Auswertung der *realtime* PCR wird mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak durchgeführt. Um oben genannte Fehlerquellen auszuschließen, wird zunächst das untersuchte Gen durch GAPDH normalisiert.

Bildung von  $\Delta C_T$ :

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

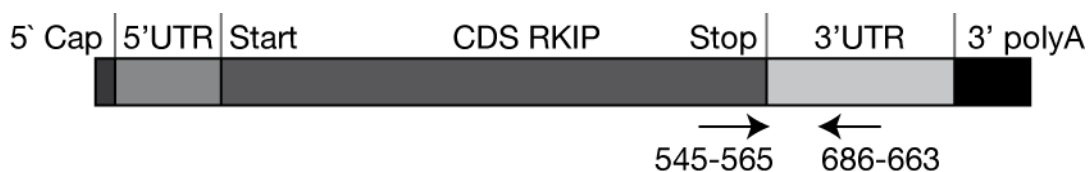
Dann werden die unterschiedlichen Expressionslevels des untersuchten Gens als n-fache Expression eines basalen Zustands angegeben. In diesem Fall dienen unbelastete Wildtyptiere als Basalwert:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{belastet/anderer Genotyp}) - \Delta C_T (\text{Mittelwert der basalen Wildtypen})$$

Da pro Zyklus eine Verdopplung der amplifizierten Fragmente stattfindet, wird die n-fache, normalisierte Expression eines Gens im Verhältnis zum basalen Zustand (unbelastete Wildtypiere) durch diese Gleichung berechnet:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Der Nachweis des RKIP-Knockouts auf mRNA-Ebene mittels *realtime* PCR gestaltet sich im Falle der RKIP<sup>-/-</sup>-Tiere relativ kompliziert. Da 556 der 561 kodierenden Basenpaare identisch mit der Gensequenz der im Herzen exprimierten  $\alpha$ -Untereinheit von Gq der Gattung *Mus musculus* ist, können nicht beide Primer in der kodierenden Sequenz für RKIP platziert werden. Ein Primer muss für eine ausreichende RKIP-Spezifität in der 3'UT-Region von PEBP1 lokalisiert sein. Abbildung 11 zeigt diese Primerplatzierung schematisch auf:



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der RKIP mRNA mit Primerpositionen (Pfeile); 5'-Kappe; 5'UT-Region (5'UTR); Start- und Stopcodon; für RKIP kodierende Sequenz (CDS RKIP); 3'UT-Region (3'UTR); 3'-polyA-Schwanz.

## 2.2.8 Kontraktionsverhalten und Kalziumkinetik isolierter Kardiomyozyten

Zur weiteren Erörterung der phänotypischen Veränderungen in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen werden Untersuchungen des Kontraktions- und Relaxationsverhaltens, sowie der dafür zugrunde liegenden Kalziumkinetik an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt.

### 2.2.8.1 Präparation adulter Kardiomyozyten

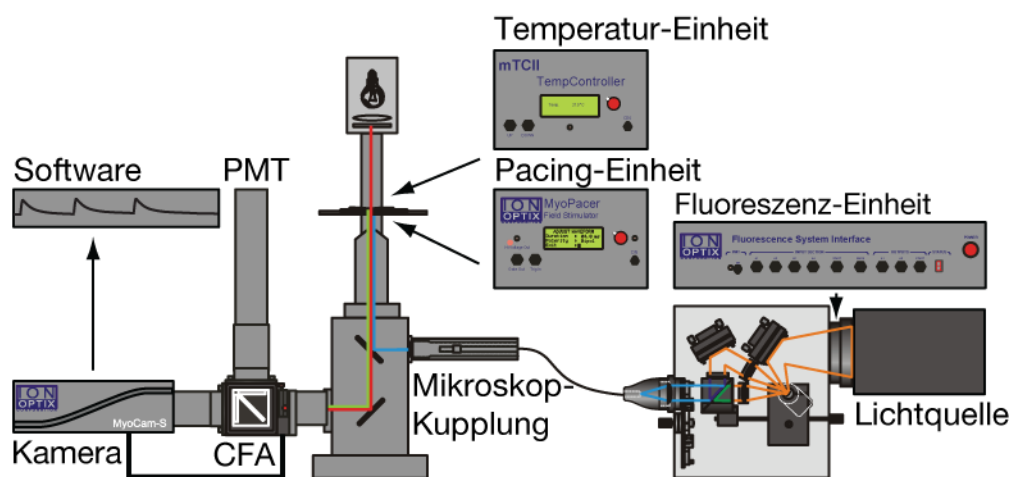
Die Präparation adulter Kardiomyozyten erfolgt aus zwischen acht und zehn Wochen alten Mäusen im C57BL/6J-Hintergrund, wobei wildtypische, als auch RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse herangezogen werden. Die adulten Kardiomyozyten werden durch retrograde Perfusion mittels enzymatischen Verdauens aus dem zellulären Verbund gelöst und mit Hilfe eines Filtrationsschrittes aus der Suspension getrennt<sup>94</sup>.

Die perizelluläre Kalziumkonzentration muss nun stetig und in für die Kardiomyozyten nicht letalen Schritten an die Kalziumkonzentration des Pufferbads in der Messapparatur angepasst werden. Hierfür werden der Stopppufferlösung in vierminütigen Intervallen jeweils 10µl, 20µl, 30µl und 40µl einer 100mM Kalziumlösung appliziert. Schlussendlich kann das Pufferbad durch eine 1mM Kalziumpufferlösung ersetzt werden.

Im Anschluss erfolgt die Aufteilung der Zellsuspension in mehrere Fraktionen und die Beladung darin enthaltener Herzmuskelzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff *fura-2*. Dafür wird der ersten Fraktion für 15 Minuten 1µmolarer *fura-2*-Acetoxymethylester beigefügt. Es erfolgt eine Veresterungsreaktion, die es *fura-2* ermöglicht, nach intrazellulär zu diffundieren, wo wiederum eine durch intrazellulär vorliegende Esterasen durchgeführte Abspaltung des Acetoxymethylesters stattfindet. *fura-2* liegt nun geladen, also nicht membrangängig und damit zwangsläufig intrazellulär vor. Es erfolgen zwei achtminütige Waschschrte mit 1mM Kalziumpuffer und der abschließende Wechsel des Puffers auf einen Messpuffer mit einer Kalziumkonzentration von 1,2mM.

### 2.2.8.2 Messungen zur intrazellulären Kalziumkinetik und zum kardiomyozytären Kontraktionsverhalten

Das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten wird zum Einen mit Hilfe eines *edge-to-edge-detection* Videosystems erfasst, welches die Verkürzung der gesamten Muskelzelle aufzeichnet. Zum anderen wird durch hochauflösende Videoaufnahmen die Änderung der Sarkomerlänge dokumentiert. In Kombination mit dem *dual-excitation-single-emission Photomultiplier* der Firma Ionoptix TM (Milton, USA) ist zudem im selben Arbeitsschritt eine Untersuchung der Kalziumkinetik mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *fura-2* möglich. In Abbildung 12 ist der Aufbau der Messapparatur schematisch dargestellt.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der Apparatur zur Messung des Kontraktionsverhaltens und der Kalziumkinetik; CFA = Cell Framing Adapter, PMT = Photo Multiplier; Ionoptix 2011, modifiziert.

Nach Durchtritt durch einen 550nm Langpass-Filter fällt kontinuierlich Licht auf die sich im Messbecken (siehe Pfeilziele in Abb. 14) befindlichen Herzmuskelzellen. Durch diesen Filter bleibt die Qualität des Fluoreszenzfarbstoffes länger erhalten. Es erfolgt eine Auftrennung des emittierten Lichtes mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels, wodurch Licht mit einer Wellenlänge als 550nm zum Kamerasystem (MyoCam IonOptix TM) geleitet und das von *fura-2* emittierte Licht mit kürzeren Wellenlängen Richtung Photomultiplier reflektiert wird. Eine Xenonbogenlampe mit einer Leistung von 75W dient als Lichtquelle. Die Anregungswellenlängen von *fura-2* liegen bei 340nm - sofern an Kalzium gebunden- und bei 380nm in ungebundenem, freiem Zustand. Diese

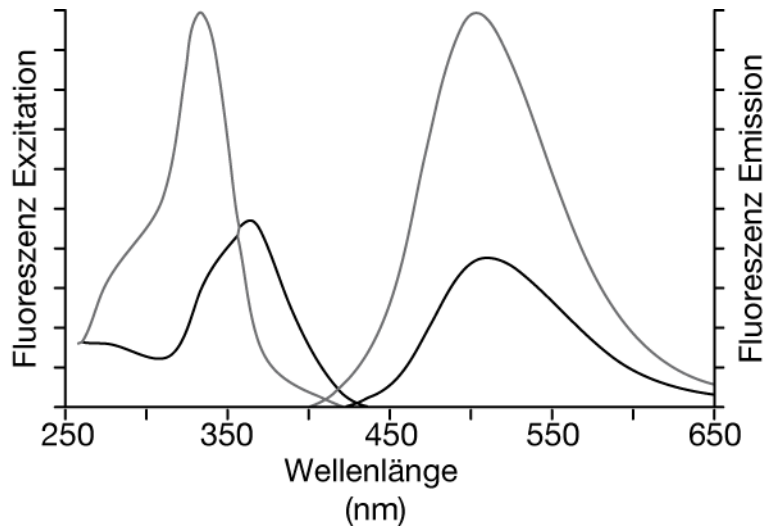


beiden Wellenlängen werden mit Hilfe eines rotierenden Spiegels (HyperSwitch light source system, IonOptix TM) erzeugt. Durch ihn gelangt das Licht über zwei verschiedene Filter schließlich in das unterhalb des Messbeckens platzierte inverse Mikroskop (Motic AE31).

Die im Messbecken befindlichen Zellen werden kontinuierlich von Messpuffer mit einer Kalziumkonzentration von 1,2mM und einer Temperatur von 27,0 °C umspült. Mit Hilfe des rotierbaren Kamerasystems (Cell-framing-adapter IonOptix TM) wird eine für die Messung geeignete Zelle auf dem Bildschirm zentriert und horizontal dargestellt. Geeignet ist die Zelle dann, wenn sie deutlich abgrenzbare, nicht abgerundete Zellgrenzen, sowie keinerlei spontane Kontraktion aufweist. Am verwendeten Messbecken (FHD Microscope Chamber System, IonOptix) ist es mit Hilfe eines angeschlossenen Pacers (Myopacer, IonOptix) möglich, die Kardiomyozyten für jeweils 3ms mit einer Frequenz von 0,5Hz und einer Spannung von 20V zu stimulieren. Durch eine zum System passende Software (Ionwizard, IonOptix) erfolgt die Erfassung der Messdaten.

Um die Kontraktion der Zelle optisch zu quantifizieren, wird in der Software die Zellgrenze markiert und bei Kontraktion vom System verfolgt. Aufgrund sehr störungsanfälliger Messungen bei Erfassen beider gegenüberliegender Zellgrenzen wird nur die rechtsseitige Kontraktion der Zelle gemessen und später ausgewertet. Um die Kontraktion auf Sarkomerebene zu detektieren, wird ein Messfenster über einer störungsfreien, kontrastreichen intrazellulären Region platziert.

Im selben System kann eine Messung der Kalziumkinetik mit Hilfe von *fura-2* stattfinden. Bei *fura-2* handelt es sich um einen *dual-excitation-single-emission* Fluoreszenzfarbstoff, als auch einen Kalziumchelator. Die Anregungswellenlängen wechseln in hoher Frequenz zwischen 340nm (an Kalzium gebundener Farbstoff) und 380nm (ungebunden), während das Emissionsspektrum unverändert zwischen 480nm und 520nm verbleibt. Die Anregungs- und Emissionsspektren von an Kalzium gebundenem und freiem *fura-2* sind in Abbildung 13 dargestellt:

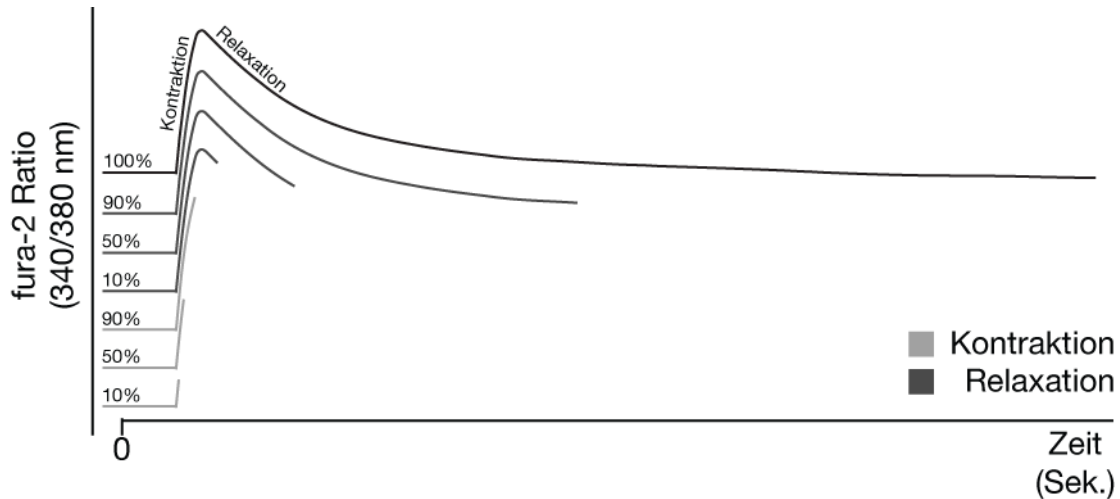


**Abb. 13:** Anregungs- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von *fura-2* in an Kalzium gebundenem (graue Kurve) und freiem (schwarze Kurve) Zustand.  
Sigma Aldrich, modifiziert.

Aus beiden Emissionen während der verschiedenen Anregungswellenlängen wird eine *ratio* gebildet, wobei der Numerator (Zähler) die Emission bei 340nm (gebunden) und der Denominator (Nenner) die Emission bei 380nm (ungebunden) darstellt. Somit ist die gebildete *ratio* proportional zur intrazellulären Kalziumkonzentration.

### 2.2.8.3 Auswertung der gemessenen Daten

Mit Hilfe der zum System passenden Software Ionwizard kann das Kontraktionsverhalten und die Kalziumkinetik sowohl aufgezeichnet, als auch ausgewertet werden. Am Beispiel der in Kap. 2.2.8.2 beschriebenen *fura-2 ratio* sollen die verwendeten Parameter erläutert werden. Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung eines vollständigen Verlaufs dieser Ratio (schwarz / 100%) nach Stimulation einer Herzmuskelzelle. Alle für ein Tier gemessenen Ratios werden im Anschluss gemittelt. Es erfolgt ein Ausschluss unregelmäßiger, bzw. deformierter Peaks. Der Startpunkt einer Messung eines Peaks wird bei 0,2 Sekunden vor Beginn eines Stimulus festgelegt ( $t=0$  in Abb. 16) und dauert 1,2 Sekunden.



**Abb. 14:** Schema über gemessene Vergleichspunkte (in Sekunden) der *fura-2 ratio* (10%, 50%, 90%) während der Kontraktion (helle Kurven) und Relaxation (dunkle Kurven).

Die Basislinie wird mit den Werten von Numerator und Denominator zur Störgrößenbeseitigung korrigiert. Daraufhin kann die Analyse des Kurvenverlaufs und damit der Kalziumkinetik vorgenommen werden. Hierfür werden folgende Parameter ermittelt:

- I. Zeit bis zum Erreichen von 10%, 50% und 90% der Peakhöhe, gemessen ab der Basislinie (helle Kurven in Abb. 16) als Kontraktions-Parameter.
- II. Zeit bis zum Erreichen von 10%, 50% und 90% der Basislinie, gemessen ab der Peakhöhe (dunkle Kurven in Abb. 16) als Relaxations-Parameter.

Die Evaluation der Video-gestützten Daten auf zellulärer und Sarkomerebene erfolgte äquivalent zu den Punkten I und II.

#### 2.2.8.4 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde die Software GraphPad Prism (San Diego, USA) verwendet. Ein P-Wert von  $P < 0,05$  wird als statistisch signifikant angesehen. Alle Datensets sind normalverteilt. Die Ergebnisdarstellung erfolgt in allen Graphen mittels Durchschnittswert  $\pm$  Standardfehler (*Mean  $\pm$  SEM*). Für eine statistische Untersuchung von zwei Gruppen wird der T-Test herangezogen. Sollen mehrere Gruppen

verglichen werden, erfolgt eine Varianzanalyse (*analysis of variance* / ANOVA). Die Alphafehlerkumulierung wird mittels Bonferroni-Korrektur neutralisiert.

## 3 Ergebnisse

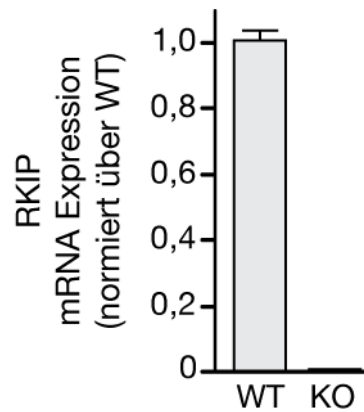
Während kardialen Stresses kommt es zu einer Zunahme der RKIP-Expression im Herzen. Sowohl in Mäuseherzen, welche dem Stress einer chronischen Nachlastserhöhung durch dreiwöchige TAC ausgesetzt sind, als auch in humanen Herzmuskelpräparaten von Herzinsuffizienzpatienten kann dies gezeigt werden<sup>84</sup>. Dies lässt eine potenziell kardioprotektive Funktion von RKIP vermuten und gibt weiteren Anlass zur näheren Deskription der endogenen RKIP-Funktion im Herzen.

### 3.1 RKIP-Knockout und dessen Einfluss auf die intrazelluläre Signalwege

#### 3.1.1 Nachweis des RKIP-Knockout

Um die endogene Rolle von RKIP näher beschreiben zu können und zu eruieren, ob sich die unphysiologische Abwesenheit von RKIP auf die Herzfunktion auswirkt, werden Mäuse genutzt, die einen ubiquitären RKIP-Knockout aufweisen. Wie in Kap. 2.1.1 bereits beschrieben, werden hierfür aus heterozygoten RKIP-Knockout-Mäusen (RKIP<sup>+/-</sup>) des *Mutant Mouse Regional Resource Center* (Davis, Kalifornien) homozygote RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse im C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet. Mittels *En2-Splice-Site*-abhängigem *Gen-Trapping*-Vektor zwischen Exon 3 und 4 der RKIP-Sequenz erfolgt ein transkriptioneller Abbruch und damit eine Verhinderung der Genexpression.

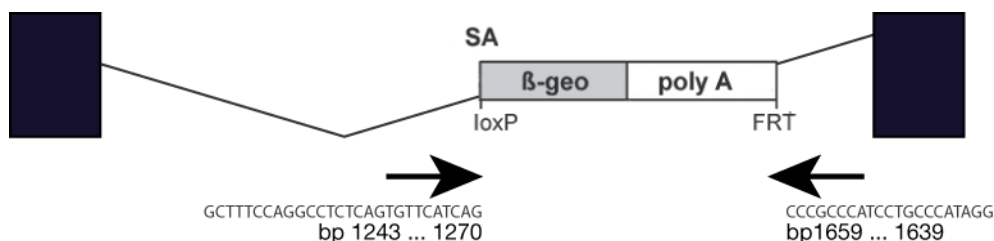
Dies wird mit Hilfe einer *Realtime*-PCR gezeigt: In Abbildung 15 ist die fehlende mRNA Expression von RKIP in Herzen von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zur physiologischen RKIP-Expression in Wildtyptieren dargestellt. Für Informationen zur Platzierung der *Primer* sei auf Kapitel 2.2.7.3 verwiesen.



**Abb. 15:** Kardiale mRNA Expression von RKIP in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ; n=4-5;

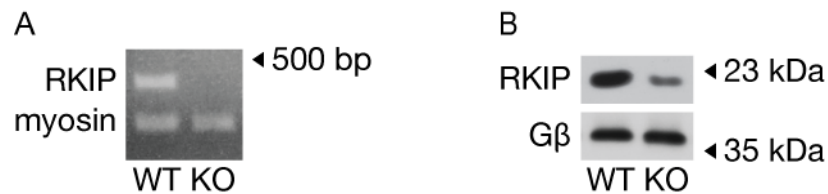
Des Weiteren erfolgt die Kontrolle des erfolgreich auf beiden Allelen eingebrachten Gen-*Trapping*-Vektors mittels PCR-Genotypisierung. Hierfür werden Primerpaare um den Locus des Vektors platziert. Durch die Länge der zwischen den Primern liegenden Kasette ist der zu amplifizierende Abschnitt zu lang, als dass eine Abschrift mittels Polymerase erfolgen kann. Im Falle einer homozygoten Insertion, also einer Insertion auf beiden Allelen, erfolgt deshalb keine Amplifikation mittels PCR (s. 17A). Diese Genotypisierungs-PCR wurde durch die Technische Assistentin Martina Fischer durchgeführt.



**Abb. 16:** Schematische Darstellung der für die Genotypisierung verwendeten Primerplatzierung um die zwischen Exon 3 und Exon 4 (graue Kästen) eingebrachte Kasette.

Um die sich durch oben beschriebenes Konstrukt ergebende homozygote Deletion von RKIP auch auf Proteinebene zu zeigen, wird die RKIP-Protein-Expression in den Herzen dieser Tiere untersucht. Hierfür wird apikales, linksventrikuläres Gewebe wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben aufbereitet. Anschließend können die kardialen Proteine ihrer

Größe nach mittels SDS-Page aufgetrennt und RKIP schlussendlich mit Hilfe der Immunodetektion sichtbar gemacht werden:



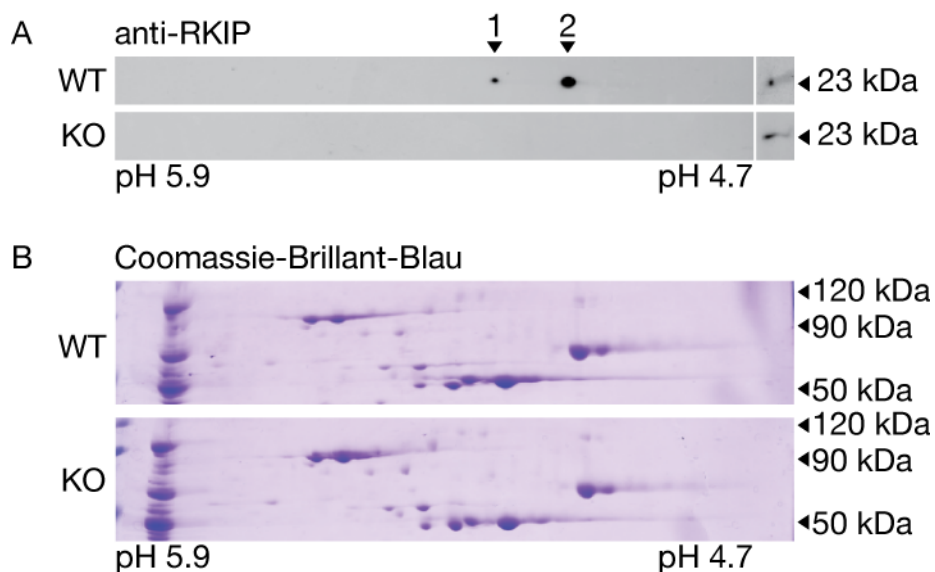
**Abb. 17:** **A:** PCR-Genotypisierung von homozygoten  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen; Platzierung der Primerpaare um den Locus des eingebrachten Gene-Trapping-Vektors; Myosin als Ladekontrolle. **B:** Immunoblot nach Anti-RKIP in Wildtyp- und homozygoten  $RKIP^{-/-}$ -Mäuseherzen;  $G\beta$  als Ladekontrolle.

Abbildung 17B zeigt den Vergleich der kardialen RKIP-Expression zwischen Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Tieren im Immunoblot. In diesen Versuchen ist ein persistierendes, abgeschwächtes Signal auf der Laufhöhe von RKIP messbar. Somit ist es mit allein dieser Methode nicht möglich, die RKIP-Deletion auf Proteinebene zufriedenstellend nachzuweisen (s. zusätzlich Kap. 4.1).

Zur weiteren Erörterung der Ätiologie dieser fraglich unspezifischen Bande wird die sogenannte 2-D-Gelelektrophorese genutzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist eine besonders hochauflösende Trennung komplexer Proteingemische möglich. Sie beruht auf der Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE, sowie der orthogonalen Ausführung dieser beiden Verfahren zueinander. Mit Hilfe der IEF im ersten Schritt werden die Proteine innerhalb eines pH-Gradienten-Gels im elektrischen Feld eindimensional nach ihrer Ladung aufgetrennt. In Abhängigkeit des Umgebungs-pH-Werts im Gel durchlaufen sie De- und Protonierungszustände und ändern so Ihre Ladung. Am sogenannten isoelektrischen Punkt neutralisieren sich positive und negative Ladungen der Proteine und es findet keine Bewegung mehr im elektrischen Feld statt<sup>95</sup>. Im zweiten Schritt erfolgt orthogonal dazu die Größenaufteilung der Proteine mittels SDS-PAGE.

Das Ergebnis dieser 2-D-Gelelektrophorese ist in Abbildung 20A dargestellt. Um eine möglichst hochauflösende ladungsabhängige Auftrennung des Proteingemisches zu erzielen, wurde eine schmale pH-Bandbreite zwischen pH 5,9 und pH 4,7 gewählt. In wildtypischen Tieren zeigt sich nun sowohl die unphosphorylierte („1“), als auch die phosphorylierte („2“) Form von RKIP, während in  $RKIP^{-/-}$ -Tieren die Proteine, die im

konventionellen Immunoblot für die persistierende Bande verantwortlich sind (s. rechte Spalte 18A), durch die IEF außerhalb des abgebildeten Fensters zum Liegen gekommen sein müssen und deshalb nicht mehr sichtbar sind. Somit kann mit diesem Versuch die fehlende RKIP-Expression in  $RKIP^{-/-}$ -Tieren auch auf Proteinebene gezeigt werden <sup>84</sup>. Abbildung 18B zeigt eine Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Regionen aus Abbildung 18A als Gel-Ladekontrolle. Die 2-D-Gelelektrophorese wurde von Doktorandin Evelyn Schmid durchgeführt.



**Abb. 18:** **A:** 2D-SDS Gelelektrophorese nach anti-RKIP in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäuseherzen. Diese zeigt, dass das anti-RKIP Signal in  $RKIP^{-/-}$ -Mäuseherzen ein unspezifisches ist. Um unspezifische Proteine auszuschließen, wurde zur isoelektrischen Fokussierung eine schmale pH-Bandbreite zwischen pH 4,7 und pH 5,9 verwendet. Rechte Spalte: eindimensionale Auftrennung des Proteinlysats ohne isoelektrische Fokussierung. „1“: unphosphoryliertes RKIP. „2“: phosphoryliertes RKIP. **B:** Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Regionen aus A als Ladekontrolle. Schmid et al., 2015, modifiziert.

Nachdem der Knockout von RKIP auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen ist, stellt sich die Frage, ob das Fehlen von RKIP Einfluss auf im physiologischen Zustand durch RKIP modulierte Signalwege hat.

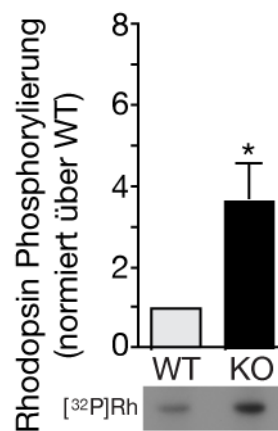
### 3.1.2 Einfluss der Deletion von RKIP auf die kardiale Aktivität der GRK

Es konnte bereits gezeigt werden, dass RKIP im Herzen vor allem phosphoryliert <sup>68</sup> und damit als Inhibitor der kardialen GRK2 <sup>69</sup> vorliegt. Die kardiale RKIP-Wirkung



scheint daher vor allem durch die Wirkung auf die kardiale GRK vermittelt zu sein. Aus diesem Grund wird mittels radioaktivem Phosphorylierungsassay deren Aktivität untersucht (s. auch Kap. 2.2.6.1). Hierbei wird sich die Fähigkeit der GRK zu Nutze gemacht, *in vitro* die G $\beta$  $\gamma$ -vermittelte Phosphorylierung von Rhodopsin inhibieren zu können<sup>93</sup>.

Abbildung 19 zeigt den Vergleich der Aktivität der GRK in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen. Hier wird die signifikant höhere Kinaseaktivität in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen sichtbar, was die wegfallende Hemmung der GRK durch RKIP in diesen Tieren widerspiegelt. Die hier beschriebenen Aktivitätsassays wurden durch Dr. Katharina Deiss durchgeführt.



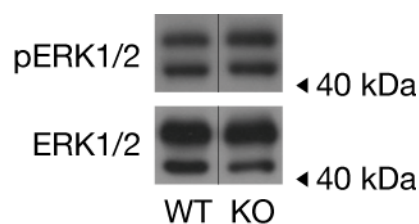
**Abb. 19:** Kardiale Rhodopsin-Phosphorylierung in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Mean $\pm$ SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ; Schmid et al., 2015, modifiziert.

Als namensgebender, weiterer Interaktionspartner von RKIP sei Raf1 als Bestandteil der MAPK-Kaskade genannt. Dass RKIP im Herzen vor allem phosphoryliert, damit dimerisiert und dissoziiert von Raf1 vorliegt<sup>68</sup>, ist ein Hinweis darauf, dass RKIP kardial wahrscheinlich geringen oder keinen regulatorischen Einfluss auf die MAPK-Kaskade hat. Deshalb soll ergänzend zur kardialen GRK-Aktivität auch die Phosphorylierung und damit der Aktivierungsgrad von kardialen ERK1/2 als Effektorkinasen der MAPK-Kaskade in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen überprüft werden.

### 3.1.3 Einfluss der Deletion von RKIP auf die Phosphorylierung von ERK1/2 im Herzen

ERK1/2 als Bestandteil der MAPK-Kaskade ist maßgeblich an der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie des Herzen beteiligt<sup>96</sup>. Um den Grad der kardialen ERK1/2-Phosphorylierung und damit Aktivität dieser unter anderem an der pathologischen Hypertrophie des Herzens beteiligten Kinase in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Wildtypen vergleichen zu können, wird diese Phosphorylierung mittels Immunoblot untersucht.

In Abbildung 20 ist exemplarisch die Phosphorylierung von ERK1/2 in RKIP<sup>-/-</sup>- und Wildtypherzen dargestellt.



**Abb. 20:** Exemplarische ERK1/2-Phosphorylierung in Herzen aus Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. ERK1/2 als Expressionskontrolle. Die Banden wurden nach Versuchsdurchführung digital nebeneinander dargestellt (vertikale Trennlinie).

Hier zeigt sich kein Unterschied des Phosphorylierungsgrads von kardialem ERK1/2 zwischen RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypieren. In RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren wird Raf1 und damit die MAPK-Kaskade durch den Mangel an RKIP nicht durch selbiges reguliert. Dass sich ein äquivalenter ERK1/2-Phosphorylierungsgrad in wildtypischen Herzen zeigt und gleichzeitig in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen eine gesteigerte GRK-Aktivität vorliegt, unterstreicht die durch Deiss et al. propagierte Theorie, dass RKIP im Herzen nicht als Inhibitor von Raf1 fungiert, sondern PKC-abhängig<sup>69</sup> hauptsächlich als GRK-Inhibitor wirkt.

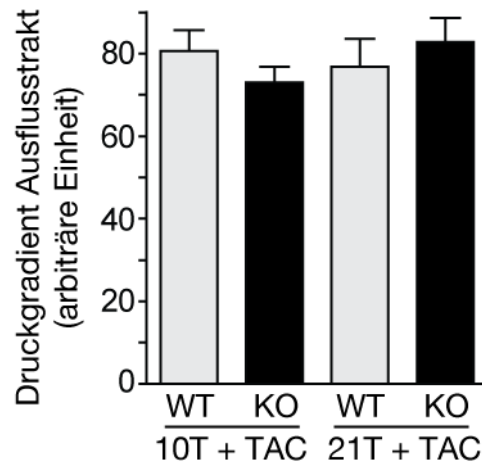
Um die phänotypische Wirkung der Deletion von RKIP und damit der erhöhten GRK-Aktivität in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen näher beschreiben zu können, werden *in vivo* Studien mit diesen Tieren durchgeführt.

## 3.2 Phänotyp von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen

Um *in vivo* die endogene Rolle von RKIP im Herzen weiter zu untersuchen, werden RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse unter basalen Ruhe-, als auch unter Stressbedingungen bei chronischer Nachlasterhöhung durch dreiwöchige TAC untersucht. Für diese Phänotypisierung werden verschiedene Methoden genutzt. Es wird die kardiale Pumpfunktion mit Hilfe der Echokardiographie untersucht und über das Lungengewicht ein Rückschluss auf den durch ein mögliches Rückwärtsversagen des linken Ventrikels verursachten pulmonalen Blutstau gezogen. Die Expression von im klinischen Alltag herangezogenen Herzinsuffizienzmarkern wird quantifiziert und der Bindegewebige Umbau und die Apoptose im Herzen, also das kardiale *Remodeling* untersucht. Des Weiteren wird die Hypertrophie des Herzmuskels beurteilt und als abschließender Versuch die Lebensdauer der Tiere verglichen.

### 3.2.1 Quantifizierung der durch TAC erzielten Nachlasterhöhung

Um durch TAC einen vergleichbaren kardialen Stress sowohl in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen, als auch in Wildtypmäusen zu induzieren, erfolgt eine echokardiographische Kontrolle des Druckgradienten über der künstlichen Stenose zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *Arteria carotis sinistra* nach 10 und 21 Tagen. Ausschlusskriterium ist ein Druckgradient unter 60 mmHg. Wie in Abbildung 21 zu sehen, wurde in den wildtypischen, als auch in den RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren eine vergleichbare Nachlasterhöhung durch TAC erzielt.

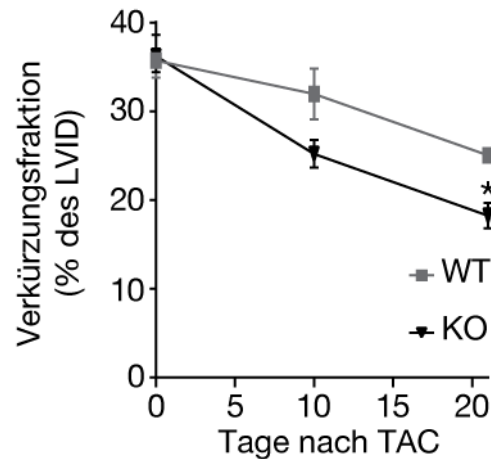


**Abb. 21:** Mittels Doppler-Ultraschall bestimmte Druckgradienten über Konstriktion der Aorta zwischen *Truncus brachiocephalicus* und *Arteria carotis sinistra*. Arbiträre Einheiten.

Mean $\pm$ SEM;  $p > 0,05$ ;  $n = 3-12$ ;

### 3.2.2 Beurteilung der kardialen Pumpfunktion

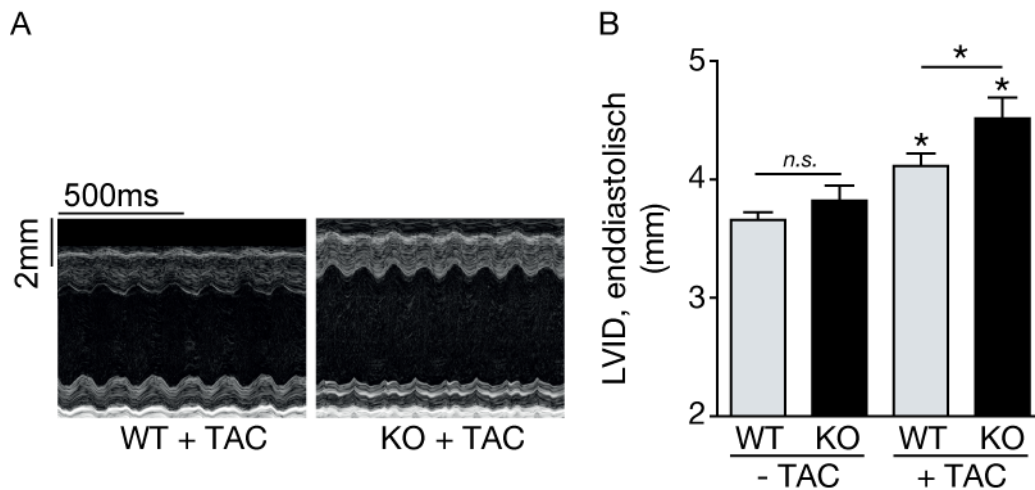
Für die Bestimmung der kardialen Pumpfunktion *in vivo* wird unter anderem die transthorakale Echokardiographie genutzt. Als echokardiographischen Parameter für die linksventrikuläre Kontraktilität wird die Verkürzungsfraction herangezogen (s. Kap. 2.2.2.3). Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, ist unter basalen Ruhebedingungen ohne TAC (hier an Tag 0) kein Unterschied in der linksventrikulären Funktion zwischen Wildtyptieren und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen messbar. Allerdings verschlechtert sich die Kontraktilität des linken Ventrikels in den RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren nach TAC zusehends, sodass nach dreiwöchiger, chronischer Nachlasterrhöhung durch TAC eine deutlich verschlechterte kardiale Pumpfunktion der RKIP<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen vorliegt.



**Abb. 22:** Echokardiographisch bestimmte Verkürzungsfraction in % des linksventrikulären, inneren Durchmesser unter Ruhebedingungen (Tag 0), sowie unter chronischer Nachlastserhöhung durch TAC (Tag 10, Tag 21) in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen.

Mean $\pm$ SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 6-11$ ;

Um die Dilatation des linken Ventrikels im Sinne einer mangelnden Kompensationsfähigkeit an die chronische Hochdruckbelastung beurteilen zu können, wird der linksventrikuläre, innere Durchmesser (*LVID*) am Ende der Diastole echokardiographisch bestimmt. Wie in Abbildung 23B dargestellt ist, ist auch hier unter Ruhebedingungen ohne TAC kein Unterschied zwischen Wildtypen und  $RKIP^{-/-}$ -Tieren messbar. Äquivalent zur geschwächten Pumpfunktion nach dreiwöchigem kardialen Stress allerdings, zeigen die  $RKIP^{-/-}$ -Mäuse nach dreiwöchiger TAC eine starke Dilatation des linken Ventrikels im Sinne einer mangelhaften Kompensationsfähigkeit der Druckbelastung durch TAC im Vergleich zu den Wildtypen. Abbildung 23A zeigt exemplarische *M-Mode*-Aufnahmen nach dreiwöchiger TAC zur Veranschaulichung der linksventrikulären Dilatation und verschlechterten Kontraktilität in  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen.

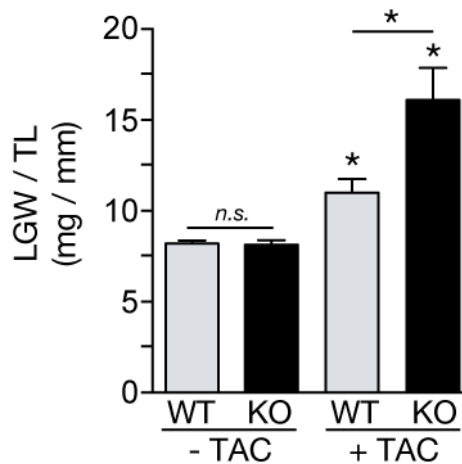


**Abb. 23:** **A:** Exemplarische, linksventrikuläre M-Mode-Aufnahmen nach dreiwöchiger TAC. **B:** Enddiastolischer, linksventrikulärer, innerer Durchmesser in mm unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterrhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen.

Mean $\pm$ SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 8-11$ ;

Ein weiterer phänotypischer Parameter für die linksventrikuläre Funktion, bzw. für ein eventuelles Rückwärtsversagen des linken Ventrikels ist das Ausmaß des blutigen Rückstaus in die Lungenstrombahn. Um diesen Rückstau zu quantifizieren, werden nach der Organentnahme ohne eine Kompression des Gewebes die Lungengewichte von Wildtypen und  $RKIP^{-/-}$ -Tieren verglichen. Um mögliche Fehler durch unterschiedliche Körpergrößen auszuschließen, erfolgt eine Normierung des Lungengewichts zur Tibiallänge der Tiere.

Abbildung 24 zeigt die Lungengewichte bei den  $RKIP^{-/-}$ - und Wildtyp-tieren unter basalen, als auch unter Stressbedingungen durch dreiwöchige TAC. Im Einklang mit den echokardiographisch erhobenen Daten zur linksventrikulären Funktion und Kompensationsfähigkeit ist unter physiologischen, stressfreien Bedingungen kein Unterschied im Lungengewicht zwischen  $RKIP^{-/-}$ - und Wildtyp-tieren messbar. Nach dreiwöchiger TAC kommt es allerdings zu einer signifikanten Zunahme des Lungengewichts bei  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen, was für ein linksventrikuläres Rückwärtsversagen und damit eine Dekompensation des linken Herzens spricht und Hand in Hand mit der verminderten Verkürzungsfraction und deutlichen Ventrikeldilatation dieser Tiere nach TAC geht.



**Abb. 24:** Lungengewichte (LGW) in mg, normiert zur Tibiallänge (TL) in mm unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterrhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen.

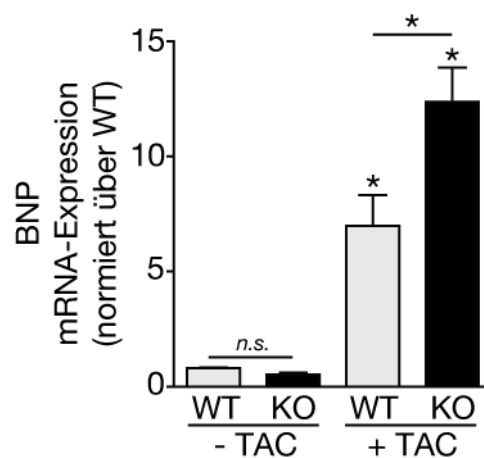
Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 11-28$ ;

Zusammenfassend lässt sich bis hierher sagen, dass sich der Mangel von RKIP unter physiologischen Ruhebedingungen nicht negativ auf die kardiale Pumpfunktion auszuwirken scheint. Allerdings verschlechtert sich diese massiv unter dem Einfluss von chronischem, kardialen Stress in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass endogenes RKIP unter diesem Stresseinfluss durchaus an der Verhinderung einer kontraktile Dysfunktion beteiligt zu sein scheint.

### 3.2.3 Expression von Herzinsuffizienzmarkern

Zur klinischen Beurteilung einer Herzinsuffizienz werden unter anderem Herzinsuffizienzmarker wie *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) und *Atriales Natriuretisches Peptid* (ANP) herangezogen. Beide Proteinkonzentrationen korrelieren mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und sind Bestandteil der kardialen Reaktion auf Überlastungssituationen. BNP ist ein 32 Aminosäuren umfassendes Protein, welches bei Dehnung der Ventrikel in Kardiomyozyten gebildet und sezerniert wird. ANP ist ein Protein mit einer Länge von 28 Aminosäuren. Maßgeblich für seine Synthese und Sekretion sind Über- bzw. Dehnungsreize des Vorhofmyokards. Sowohl BNP, als auch ANP haben über einen cGMP-abhängigen Signalweg eine vasodilatative Wirkung am Gefäß, sowie eine natriuretische und diuretische Wirkung in der Niere sind somit in der Lage, in kardialen Überlastungsreaktionen die Nachlast zu senken.

Für die Bestimmung der Expressionslevels von BNP und ANP wird die *Realtime-PCR* genutzt (s. Kap. 2.2.7). Es erfolgt eine Quantifizierung der jeweiligen Transkripte auf mRNA-Ebene. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, lassen sich sowohl für BNP, als auch für ANP unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in den jeweiligen Expressionslevels zwischen Wildtyptieren und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen feststellen. Konkordant mit der Verschlechterung der kardialen Pumpleistung kommt es nach chronischer Hochdruckbelastung allerdings zu einem signifikanten Anstieg beider Herzinsuffizienzmarker in den Herzen der  $RKIP^{-/-}$ -Tiere im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Exemplarisch ist hier die mRNA Expression von BNP gezeigt.



**Abb. 25:** Kardiale mRNA Expression von *brain natriuretic peptide* (BNP) unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen.

Normiert über GAPDH. Angabe als Vielfaches von WT unter Ruhebedingungen.

Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 4-8$ ;

### 3.2.4 Kardiales *Remodeling* in $RKIP^{-/-}$ -Mäusen

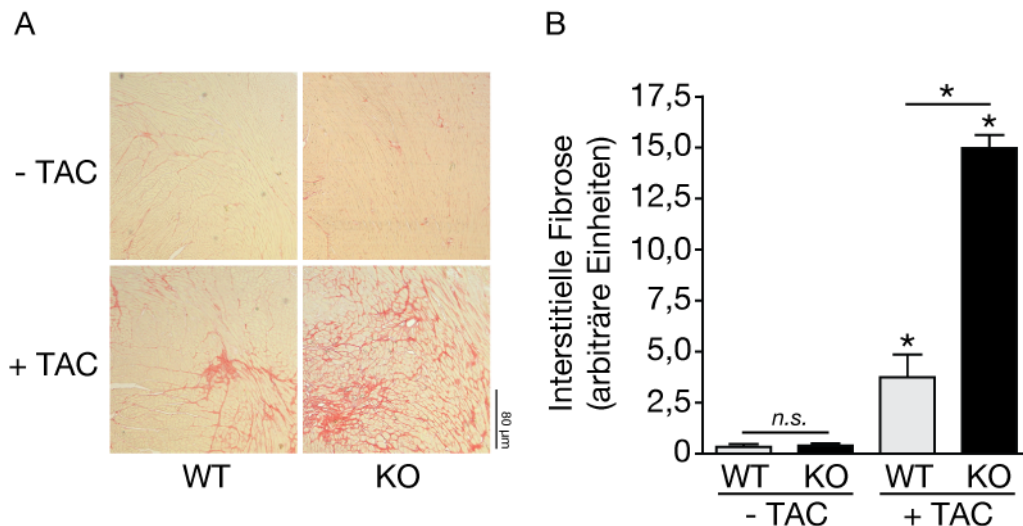
Ein wesentlicher für das rasche Fortschreiten einer Herzinsuffizienz und für den Verlust der Pumpleistung mitverantwortlicher Prozess ist das kardiale *Remodeling*<sup>97</sup>. Hierunter ist die zum größten Teil durch blutdrucksteigernde Botenstoffe wie Adrenalin und Noradrenalin und Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) vermittelte kardiale Fibrosierung, also der bindegewebige Umbau von zuvor kontraktilem Muskelgewebe, sowie die Apoptose und auch die Hypertrophie von Kardiomyozyten zu verstehen. Im klinischen Ansatz der Herzinsuffizienztherapie wird deshalb versucht, mit der Gabe von ACE-Hemmern,  $AT_1$ -Rezeptorblockern und Aldosteron-



Antagonisten hemmend in das RAAS einzugreifen und so den Prozess des *Remodeling* zu unterbrechen, bzw. zu verlangsamen<sup>98</sup>. Um diese Umbauprozesse auch im Kontext der Deletion von RKIP beschreiben zu können, werden Untersuchungen zum fibrotischen Umbau, der Apoptose und der Hypertrophie im linken Ventrikel angestellt. Letztere wird separat in Kapitel 3.2.5 beschrieben.

Um das Ausmaß der Fibrosierung quantifizieren zu können, werden zum einen Bindegewebsfärbungen von linksventrikulären histologischen Querschnitten angefertigt und analysiert (s. Kap. 2.2.4). Zum anderen erfolgt eine Quantifizierung der kardialen Expression von Kollagen 3 als Grundbaustein kollagenen Bindegewebes mittels *Real-time*-PCR (s. Kap 2.2.7).

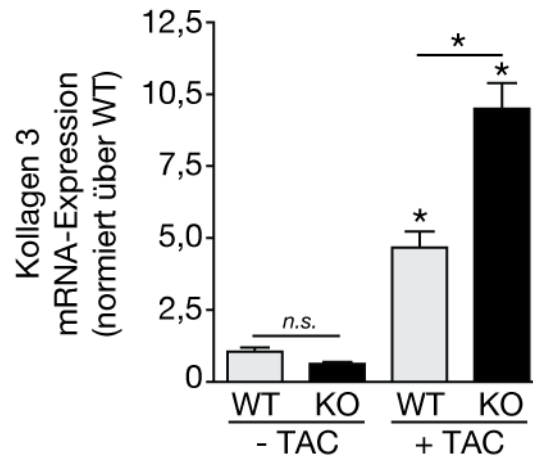
Abbildung 26 zeigt in Abschnitt A eine exemplarische Übersicht von mit Sirius-Rot gefärbten, linksventrikulären Querschnitten in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren unter physiologischen Bedingungen (-TAC) und unter chronischem kardialen Stress (+TAC). In Abschnitt B ist die Quantifizierung dieser kollagenen, fibrotischen Veränderungen aufgetragen. Kongruent zur linksventrikulären Pumpfunktion (s. Kap. 3.2.2) wirkt sich die Deletion von RKIP ohne den Einfluss kardialen Stresses nicht negativ auf die linksventrikuläre Fibrose aus. Allerdings aggraviert sich diese in den RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nach dreiwöchiger TAC deutlich, was ein weiterer Hinweis auf die endogene *Rescue*-Funktion von RKIP gegen die Entwicklung des Vollbilds einer Herzinsuffizienz unter dem Einfluss von kardialen Stress ist.



**Abb. 26:** **A:** Übersicht über beispielhafte, mit Sirius Rot gefärbte, linksventrikuläre, histologische Querschnitte unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlastserhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. **B:** Quantifizierung der interstitiellen, linksventrikulären Fibrosierung unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlastserhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Arbiträre Maßeinheit, Angabe als Vielfaches von WT unter Ruhebedingungen.

Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 4-7$ ;

Um den fibrotischen Umbau im linken Herzen weiter zu charakterisieren, wird die Expression von Kollagen 3 als Grundbaustein kollagenen Bindegewebes mittels *Real-time*-PCR quantifiziert. Abbildung 27 zeigt diese Quantifizierung unter Ruhebedingungen und nach dreiwöchiger TAC. Hand in Hand zur Auswertung der Bindegewebsfärbungen (s. Abb. 30) ist unter Ruhebedingungen kein Unterschied in der Expression von Kollagen 3 zwischen Wildtyptieren und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen messbar. Jedoch kommt es nach TAC analog zur histologisch festgestellten Fibrosierung in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen zu einer massiven Steigerung der Kollagen 3-Expression.



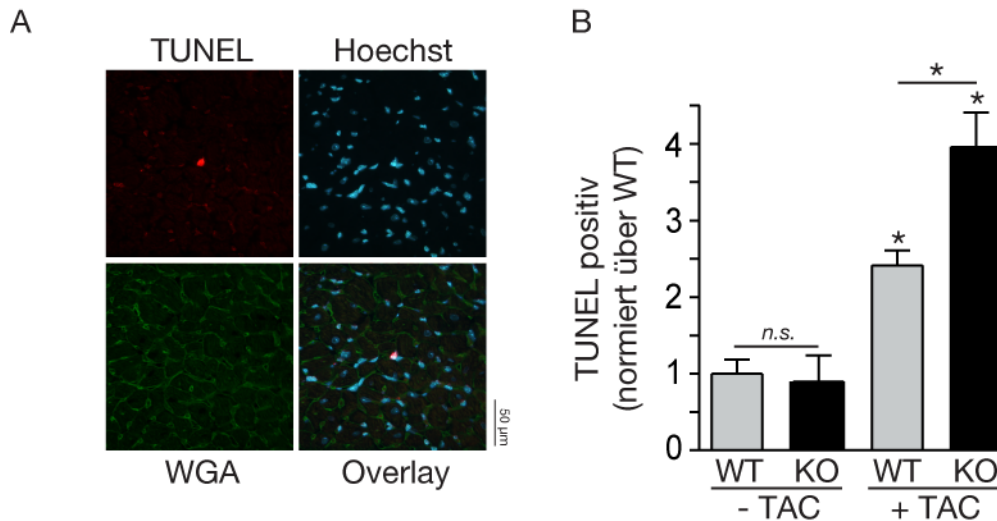
**Abb. 27:** Kardiale mRNA Expression von Kollagen 3 unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterrhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Normiert über GAPDH. Angabe als Vielfaches von WT unter Ruhebedingungen. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ; n=4-7;

Weiterer Bestandteil des Prozess des *Remodeling* ist der programmierte Zelltod, also die Apoptose von Kardiomyozyten. Die Quantifizierung dieser erfolgt in linksventrikulären, histologischen Querschnitten mittels TUNEL-Assay. Mit dieser Methode ist es möglich, durch apoptotische Signalkaskaden fragmentierte DNA in Kardiomyozyten enzymatisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar zu machen (zur Methode s. Kap. 2.2.4.4).

In Abbildung 28A ist ein exemplarisches Bild einer apoptotischen Herzmuskelzelle dargestellt. Die fragmentierte DNA wird durch die TUNEL-Färbung markiert (s. 28A links oben). Zudem werden Zellkerne als Kontrolle mit Hilfe der Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (s. Abb. 28A rechts oben). Schlussendlich werden Zellgrenzen mittels WGA angefärbt (s. Abb. 28A links unten). In der Overlay-Ansicht (s. Abb. 28A rechts unten) können alle Färbungen gemeinsam angezeigt werden. So kann eine Auswahl der apoptotischen Kardiomyozyten durch Beurteilung der typischen Morphologie von Herzmuskelzellen erfolgen.

Abbildung 28B zeigt die Quantifizierung dieser Apoptosen in Kardiomyozyten von Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Stresseinfluss und nach dreiwöchiger TAC. Konkordant zur linksventrikulären Fibrosierung zeigt sich auch in der Apoptoserate kein Unterschied zwischen Wildtypen und RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren unter Ruhebedingungen. Allerdings führt der Verlust von RKIP in RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer signifikante Zunahme der

Apoptose nach chronischer Hochdruckbelastung. Diese Ergebnisse unterstreichen einmal mehr die Theorie, dass endogenes RKIP protektiv gegen die Entwicklung des Vollbilds einer Herzinsuffizienz unter dem Einfluss von kardialen Stress zu wirken scheint.



**Abb. 28:** **A:** Beispielhafte Einzelfärbungen des TUNEL-Assay; oben links: TUNEL-Reaktion; oben rechts: Hoechst-Färbung; unten links: WGA-Färbung; unten rechts: *Overlay* aus allen drei vorherigen Bildern. **B:** TUNEL-positive Kardiomyozyten pro Herzmuskelquerschnitt unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterrhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 8-16$ ;

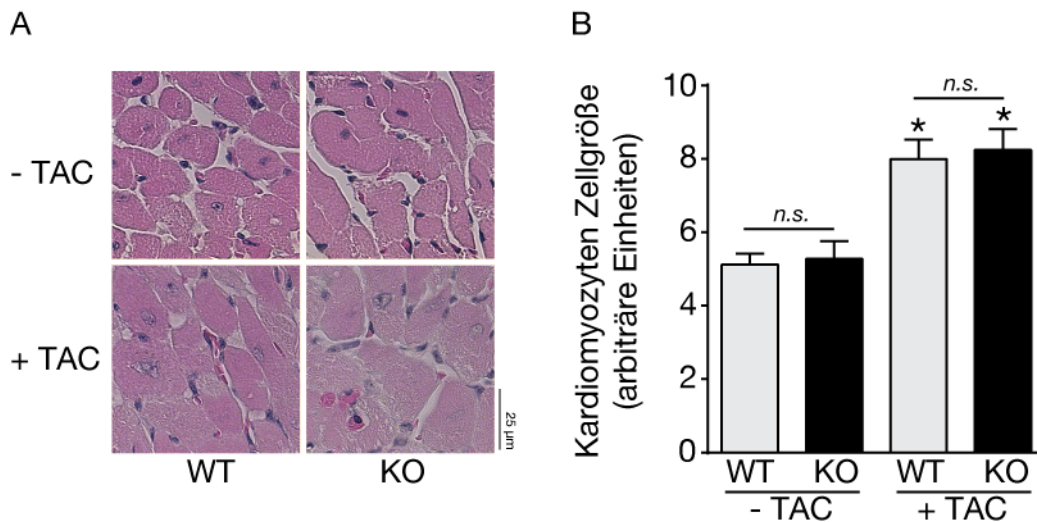
### 3.2.5 Hypertrophie

Wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt, umfasst das kardiale *Remodeling* im Rahmen einer Herzinsuffizienz neben der Fibrosierung und Apoptose von Herzmuskelzellen auch deren reaktive Hypertrophie, also Größenzunahme<sup>97,98</sup>. Diese pathologische Hypertrophie wird maßgeblich durch Aktivierung der MAPK-Kaskade vermittelt<sup>83</sup>. Da im Herzen RKIP allerdings vor allem dissoziiert von Raf1 und gebunden an die GRK als deren Inhibitor vorliegt<sup>68</sup>, stellt sich die Frage, ob sich die Deletion von RKIP in diesen Tieren überhaupt auf eine Hypertrophie von Kardiomyozyten auswirkt, oder nicht. Wie in Kapitel 3.1.3 dargestellt, zeigt sich in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen kein Unterschied in der Phosphorylierung, also dem Aktivierungsgrad von ERK1/2 als Effektorproteinen der MAPK-Kaskade. Dies unterstreicht die genannte These von Deiss et al..

Um im Rahmen der Phänotypisierung Aussagen über die linksventrikuläre Hypertrophie in  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen machen zu können, wird zum einen die Größe von Kardiomyozyten in histologischen, mit HE gefärbten, linksventrikulären Querschnitten ermittelt, sowie das Herzgewicht nach Organentnahme bestimmt. Zum anderen erfolgt die echokardiographische Messung der interventrikulären Septumdicke *in vivo*.

Abbildung 29A zeigt eine exemplarische Übersicht über mit HE gefärbte Ventrikelquerschnitte in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen vor und nach dreiwöchiger TAC. Abbildung 29B zeigt die in diesen Schnitten ausgemessenen, durchschnittlichen kardiomyozytären Einzelzellgrößen (zur Methode s. Kap. 2.2.4.5).

Im Einklang mit den Erkenntnissen, dass pathologische Hypertrophie maßgeblich durch Bestandteile der MAPK-Kaskade vermittelt wird und sich in  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen keine Veränderung der Effektorinasen ERK1/2 zeigt, ist auch in der Größenbestimmung der Einzelzellen kein Unterschied zwischen Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen sowohl unter Ruhebedingungen, als auch nach chronischer Nachlasterhöhung messbar.

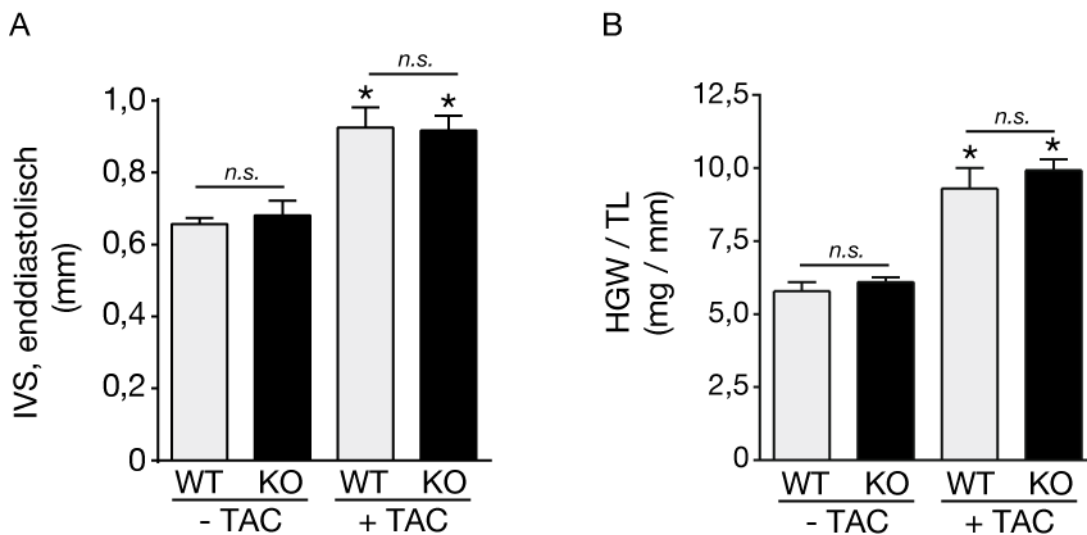


**Abb. 29:** **A:** Übersicht über beispielhafte Zellgrößen aus mit HE gefärbten, linksventrikulären, histologischen Querschnitten unter Ruhebedingungen sowie unter chronischer Nachlasterhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen. **B:** Digital bestimmte, durchschnittliche Einzelzellgrößen unter Ruhebedingungen sowie nach chronischer Nachlasterhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen. Arbiträre Maßeinheit.

Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-10$ ;

Wie bereits beschrieben, werden als weitere Parameter für die Hypertrophie des Herzmuskels zusätzlich die echokardiographische Bestimmung der interventrikulären Septumdicke und die Bestimmung des Herzgewichtes nach Organentnahme herangezogen.

Abbildung 30A zeigt die echokardiographisch bestimmte interventrikuläre Septumdicke in mm, Abbildung 30B das Herzgewicht nach Organentnahme. Um Fehler durch Größenunterschiede der Tiere auszuschließen, wird dieses Gewicht ins Verhältnis zur Schienbeinlänge der Tiere gesetzt. Hand in Hand mit der Größenbestimmung der Einzelzellen zeigt sich sowohl in der Dicke des interventrikulären Septums, als auch im Herzgewicht der Tiere kein Unterschied zwischen  $RKIP^{-/-}$ - und Wildtypmäusen.



**Abb. 30:** **A:** Echokardiographisch bestimmte, enddiastolische, interventrikuläre Septumdicke (IVS) in mm unter Ruhebedingungen, sowie unter chronischer Nachlasterhöhung durch 21-tägige TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 8-11$ ; **B:** Herzgewicht im Verhältnis zur Tibialänge unter Ruhebedingungen, sowie nach 21-tägiger TAC TAC in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen.

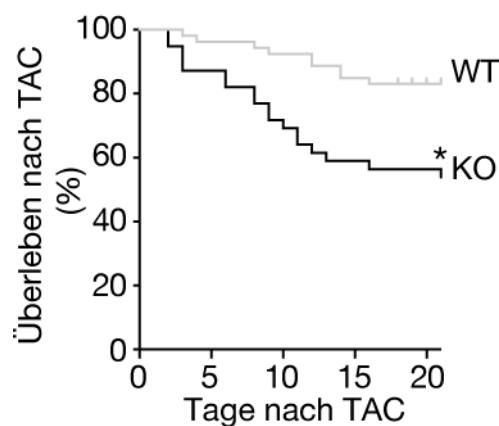
Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-18$ ;

Die Ergebnisse zur Hypertrophie und zur Aktivierung der MAPK-Kaskade (s. Kap. 3.1.3) unterstreichen somit die These, dass die Effekte von endogenem RKIP im Herzen vor allem unabhängig von der MAPK-Kaskade zu sein scheinen. Sie sind vielmehr über eine Regulation der kardialen GRK zu erklären (s. Kap. 3.1.2 und Kap. 3.2.2).

### 3.2.6 Überleben

Um den Phänotyp der RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse zu komplettieren, wurde als Endpunkt das Überleben nach chronischer Hochdruckbelastung analysiert. Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben, wirkt sich die Deletion von RKIP unter dem Einfluss von chronischem kardialen Stress durch dreiwöchige TAC negativ auf die Pumpfunktion, aber auch aggravierend auf die Entwicklung des Vollbildes einer Herzinsuffizienz in diesen Mäusen aus. Dies spiegelt die These wieder, dass endogen exprimiertes RKIP im Herzen eine Art *Rescue*-Funktion zu besitzen scheint, indem es dazu beiträgt, den kardialen Auswurf in der Stresssituation zu erhalten und kardiale Umbauprozesse, wie sie beim kardialen *Remodeling* stattfinden, zu bremsen.

Passend zum herzinsuffizienten Phänotyp von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter dem Einfluss von chronischem Stress zeigt sich bei diesen Tieren nach TAC eine verkürzte Lebensdauer und damit signifikant erhöhte Mortalität im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen (dargestellt in Abbildung 31). Dies unterstreicht die in Kapitel 3.2.1 bis Kapitel 3.2.4 dargestellten Ergebnisse.



**Abb. 31:** Kaplan Meier Überlebenskurve von Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nach TAC.

Zeit in Tagen. \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 22-25$ ;

Um die verschlechterte kardiale Pumpfunktion von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen auch auf Einzelzellebene noch näher zu charakterisieren, erfolgt zusätzlich zu den Studien *in vivo* die Untersuchung des Kontraktionsverhaltens und des Ein- und Ausstromverhaltens von Kalzium als für die Kontraktion hauptsächlich verantwortlichen Botenstoffes an isolierten Kardiomyozyten.

### 3.3 Kalziumkinetik und Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten

In Kapitel 3.1.2 wurde bereits dargestellt, dass RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse kardial eine erhöhte GRK-Aktivität aufweisen. Hand in Hand mit dieser zeigen diese Tiere in der Stresssituation eine verminderte Pumpfunktion (s. Kap. 3.2.2). Um diese *in vivo* untersuchte Herzschwäche noch näher zu charakterisieren, erfolgen spezifische Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten. Neben der Analyse der Ein- und Ausstromkinetik und intrazellulären Konzentrationen von Kalzium als für die kardiale Kontraktilität maßgeblich verantwortlichen Botenstoff durch Fluoreszenz-Echtzeit-Messungen, erfolgt die Aufzeichnung und Analyse der Kontraktion auf zellulärer und auf Sarkomerebene durch ein optisches Kamerasystem (s. Kap. 2.2.8). So kann neben dem bereits beschriebenen Pumpverhalten des gesamten Organs auch die einzelne Herzmuskelzelle als kleinster kontraktiler Baustein des Herzens beurteilt werden.

#### 3.3.1 Kalziumkinetik während Kontraktion und Relaxation

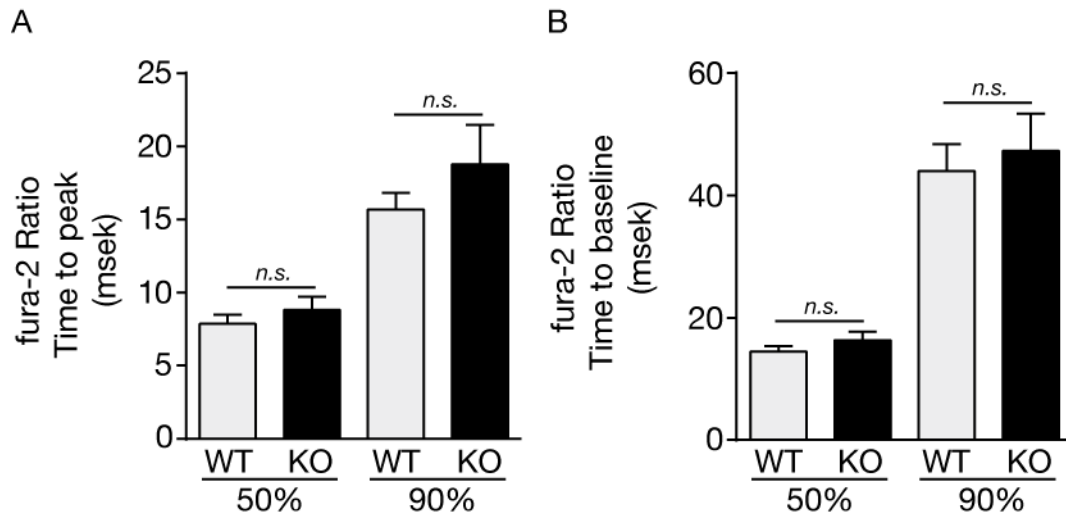
Mit Hilfe des intrazellulären, Kalzium bindenden Fluoreszenzfarbstoffs *fura-2* wird die Änderung der Konzentration von intrazellulär frei vorliegendem Kalzium kontinuierlich während Systole und Diastole gemessen<sup>99,100</sup> (zur Methode s. Kap. 2.2.8). Als Vergleichspunkte werden die Zeiten herangezogen, um 50% und 90% des maximal gemessenen Unterschieds der intrazellulären Kalziumkonzentration während der Kontraktion (*Time to peak*), bzw. Relaxation (*Time to baseline*) zu erreichen, was als Parameter für die Fähigkeit des Kardiomyozyten verwendet wird, in welcher Geschwindigkeit Kalzium als für die Kontraktion notwendiger Botenstoff bereitgestellt, als auch wieder abtransportiert werden kann.

Abbildung 32A zeigt den Vergleich der Bereitstellung von Kalzium während der Systole, also die Zeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der maximal intrazellulär vorliegenden Kalziumkonzentration in wildtypischen und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten. In diesen Messungen lässt sich kein Unterschied in der Einstromgeschwindigkeit zwischen besagten Gruppen nachweisen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich für den Abtransport von Kalzium aus der Zelle während der Diastole: Abbildung 32B zeigt den Vergleich der Zeiten, bis 50% und 90% des ma-



ximal innerhalb der Zelle vorliegenden Kalziums abtransportiert sind. Auch hier lässt sich kein Unterschied in der Ausstromgeschwindigkeit zwischen wildtypischen und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten feststellen. Das Fehlen von RKIP scheint sich unter diesen Versuchsbedingungen also nicht auf die Kalziumkinetik in Kardiomyozyten auszuwirken.



**Abb. 32:** **A:** 50% und 90% der *Time to peak* der *fura-2 ratio* in Millisekunden in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyte. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-9$ ; **B:** 50% und 90% der *Time to baseline* der *fura-2 ratio* in Millisekunden in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-9$ ;

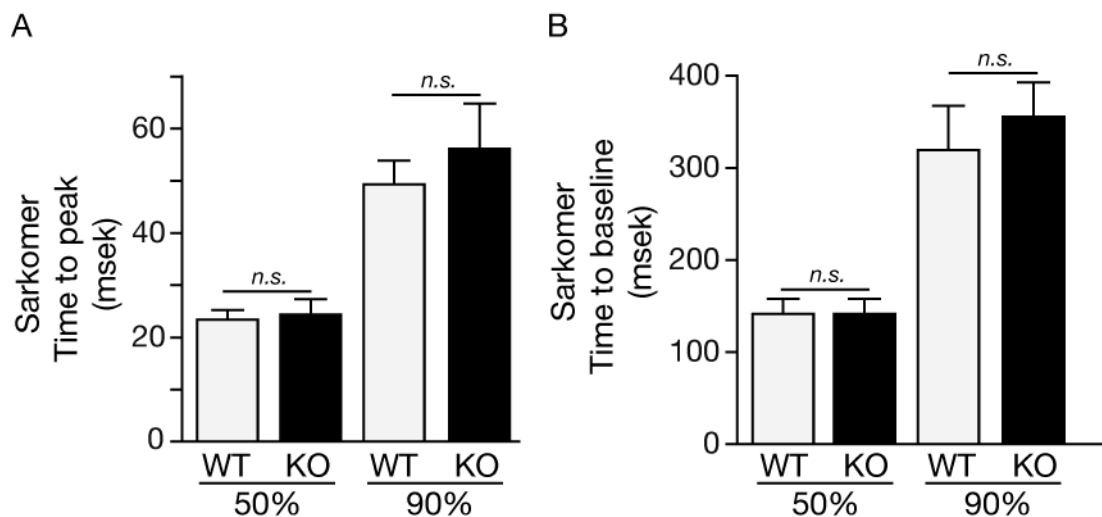
Nachdem das Ein- und Ausstromverhalten von Kalzium während der Systole und Diastole mittels *fura-2* untersucht wurde, wird der Kontraktionsvorgang der Herzmuskelzellen auf zwei unterschiedlichen Ebenen beurteilt.

### 3.3.2 Beurteilung der Kontraktion und Relaxation auf Zellebene

Mit Hilfe eines optischen Kamerasystems kann das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten zum einen durch videographische Analyse der Kontraktion des Sarkomers und damit des intrazellulären kontraktile Apparats der Herzmuskelzellen beurteilt werden. Zum anderen erfolgt die videographische Analyse der Kardiomyozyten durch Verfolgung der Zellgrenzen (zur Methode s. Kap. 2.2.8.2). Äquivalent zur Kalziumkinetik werden auch hier die Laufzeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der maximalen Kontraktion, bzw. Relaxation verglichen.

Abbildung 33A zeigt die Zeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der maximalen Kontraktion des Sarkomers in wildtypischen und  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten. Hand in Hand mit den Ergebnissen zum Kalziumeinstrom während der Systole zeigt sich kein Unterschied in der Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen wildtypischen und  $RKIP^{-/-}$ -Herzmuskelzellen auf Sarkomerebene.

Auch der Relaxationsvorgang, also das Entspannen der Herzmuskelzellen in der Diastole wird in Einzelzellen auf Sarkomerebene untersucht. Und auch in diesen Untersuchungen zeigen sich keine Unterschiede in den Zeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der kompletten Relaxation zwischen  $RKIP^{-/-}$  und Wildtypkardiomyozyten (s. 33B).

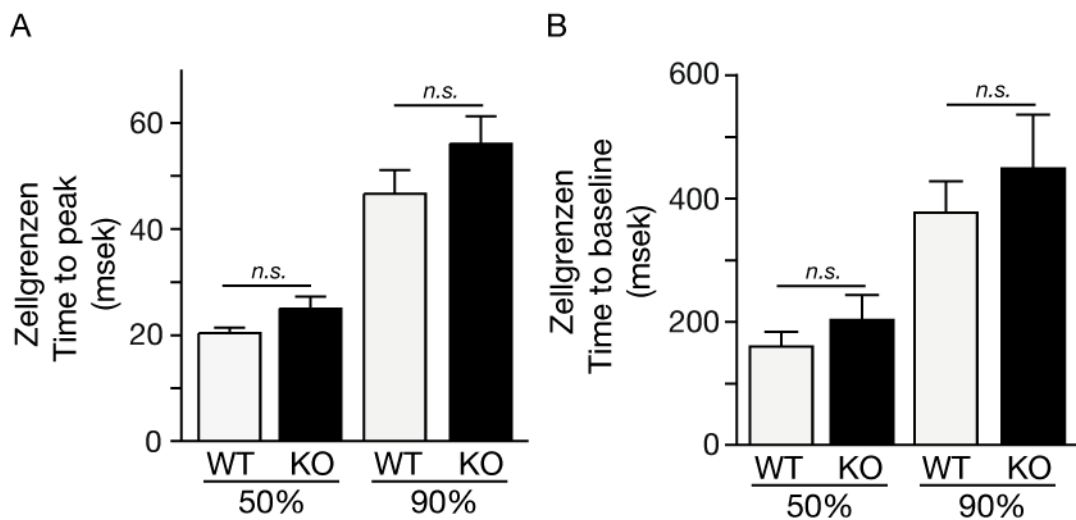


**Abb. 33:** **A:** 50% und 90% der *Time to peak* der Sarkomerlänge in Millisekunden in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-8$ ; **B:** 50% und 90% der *Time to baseline* der Sarkomerlänge in Millisekunden in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-8$ ;

In der Beurteilung des Kontraktions- und Relaxationsverhaltens mit Hilfe der videographischen Erfassung der Zellgrenzen zeigt sich ein äquivalentes Bild zur Analyse der Kontraktion und Relaxation auf Sarkomerebene.

Abbildung 36 zeigt die Laufzeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der maximalen Kontraktion der gesamten Zelle (s. 34A), sowie die Zeiten bis zum Erreichen von 50% und 90% der kompletten Relaxation der Kardiomyozyten (s. 34B) aus Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen. Hand in Hand mit den Ergebnissen zur Kalziumkinetik und des Kontraktions- und Relaxationsvorgangs auf Sarkomerebene ist auch auf zellulärer Ebe-

ne kein Unterschied in der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit zwischen Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten messbar.



**Abb. 34:** **A:** 50% und 90% der *Time to peak* der Zellgrenzen in Millisekunden in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten. Mean±SEM; \*, $p < 0,05$ ;  $n = 5-8$ ; **B:** 50% und 90% der *Time to baseline* der Zellgrenzen in Millisekunden in Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten. Mean±SEM; \*,  $p < 0,05$ ;  $n = 5-8$ ;

Um diese Ergebnisse der Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten einordnen zu können, sei nochmals auf die Untersuchungen von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vivo* verwiesen (s. Kap. 3.2). Sowohl in den Versuchen zur kardialen Pumpfunktion, als auch zum kardialen *Remodeling* zeigen sich unter basalen, physiologischen Rahmenbedingungen keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren. Der Verlust von RKIP durch einen ubiquitären Knockout macht sich erst unter dem Einfluss eines chronischen  $\beta$ -adrenergen Stresses durch dreiwöchige TAC bemerkbar. Unter diesen Bedingungen zeigen RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zur Wildtypmäusen das aggravierte Vollbild einer Herzinsuffizienz, was für eine kardiale Schutzfunktion von endogen exprimiertem RKIP spricht.

Um auch an isolierten RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten den Einfluss einer andauernden  $\beta$ -adrenergen Aktivierung zu untersuchen und damit eine Art Äquivalent zur dreiwöchigen TAC *in vivo* zu schaffen, findet im weiteren Verlauf dieser Studie zusätzlich die Untersuchung der Kalziumkinetik und des Kontraktions- und Relaxationsverhaltens unter dem Einfluss von Isoproterenol, einem Noradrenalin-Derivat und damit Sympathomimetikum statt. Für die Ergebnisse dieser von Markus Weidendorfer durchgeführten Messungen sei auf Kapitel 4.3 verwiesen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zur ubiquitären Deletion von RKIP

Für die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie konnte der ubiquitäre Knockout von RKIP auf mehreren Ebenen bestätigt werden. Zum Einen erfolgte für jedes Versuchstier eine Genotypisierung mittels PCR, bei welcher die Primerpaare um die Insertionsstellen des eingebrachten *gene-trapping* Vektors platziert wurden, um zu kontrollieren, ob das Genkonstrukt in beiden RKIP-Allelen enthalten ist (s. Kap. 3.1.1, Abb. 17A).

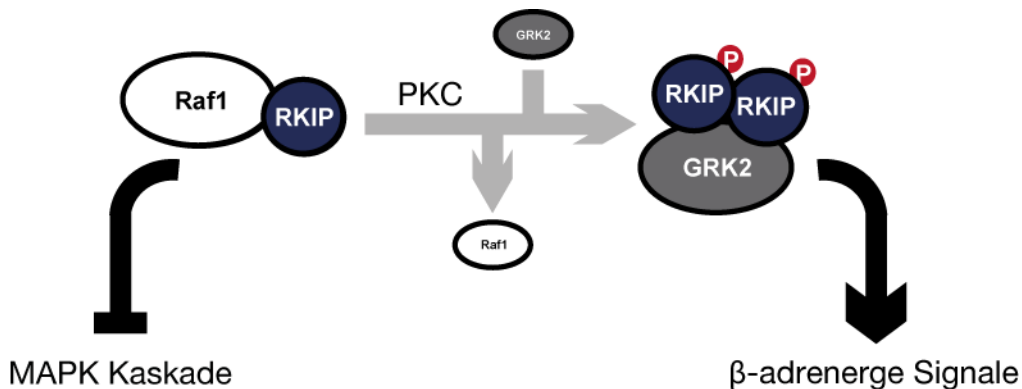
Zum anderen wurde die kardiale Transkription von RKIP (s. Kap. 3.1.1, Abb. 15) in den RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren zusätzlich mittels *realtime* PCR ausgeschlossen.

Desweiteren wurden Immunoblotverfahren angewandt, um den Knockout auf Proteinebene nachzuweisen. Wie in Abbildung 19B (s. Kap. 3.1.1) zu sehen ist, findet sich ein Anti-RKIP-Signal auf Höhe von 21kDa im Immunoblot der RKIP<sup>-/-</sup>-Tiere. Für diese Bande kommen mehrere Ursachen in Betracht: Ein Binden des Antikörpers an die Isoform PEBP2 (Gen auf Chrom. 6), deren kodierende Sequenz mit einer Länge von 564 Nukleotiden und einer Übereinstimmung von 459 Basenpaaren mit PEBP1 auch ein Proteinprodukt aus 187 Aminosäuren und einem spezifischen Gewicht von zirka 21 kDa ergibt. Laut vorherigen Studien ist die Expression dieses Proteins allerdings auf den Hoden beschränkt<sup>63,64</sup>. Eine kardiale Expression von PEBP2 konnte auch in den für dieses Projekt verwendeten Tieren mittels *realtime* PCR ausgeschlossen werden (keine Abbildung). Die anderen Isoformen PEBP4, PEBP3 und PEBP5 scheiden als weitere mögliche Ursachen für die Bande aus: Das Signal für PEBP4, eine in der Maus auf Chrom. 14 kodierte Isoform mit einer Sequenzlänge von 729 Nukleotiden, 242 Aminosäuren und damit einer Größe von 27 kDa, läge im Immunoblot nicht auf Höhe von RKIP. PEBP3 und PEBP5 werden als sog. stille Gene nicht exprimiert. Im weiteren Verlauf wurde mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt (s. 18), dass es sich bei der Bande auf Höhe von 21 kDa in den RKIP<sup>-/-</sup>-Herzen um eine unspezifische Bande handelt<sup>84</sup>.

Somit wurde in mehreren Stufen sowohl die Insertion des für den Knockout verantwortlichen Vektors, als auch die dadurch fehlende Expression von RKIP auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen.

## 4.2 Untersuchungen zur Interaktion von RKIP mit intrazellulären Signalwegen

Namensgebend für RKIP ist im monomeren, unphosphorylierten Zustand die Bindung und Inhibition von Raf1, einem Bestandteil der MAPK-Kaskade. Unter anderem vermittelt durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation ist RKIP nach PKC-abhängiger Phosphorylierung an Serin153 in der Lage, von Raf1 zu dissoziieren, zu dimerisieren und in diesem Zustand die GRK2 zu inhibieren. Die durch GRKs vermittelte Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung wird geschwächt, und das ursächliche  $\beta$ -adrenerge Signaling durch RKIP verstärkt<sup>69</sup>. Des Weiteren konnte bereits in mit PKC-Inhibitor perfundierten Mäuseherzen gezeigt werden, dass RKIP in Mäuseherzen vor allem phosphoryliert, dimerisiert und damit als Inhibitor der kardialen Isoform GRK2 vorliegt<sup>68</sup>.



**Abb. 37:** Übersicht über PKC abhängigen RKIP-switch von Raf1 zur GRK2.  
Deiss et al., modifiziert.

Da RKIP im Knockout-Mausmodell nicht exprimiert wird, kann es weder Raf1, noch die GRK2 inhibieren. In Kap. 3.1.2 konnte die dadurch fehlende Hemmung der GRK2 in den RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuseherzen in einer gesteigerten Kinaseaktivität im Vergleich zur physiologischen Situation in Wildtypen gezeigt werden. Dies steht im Einklang zur Beobachtung in RKIP überexprimierenden Mäusen: In diesen Tieren konnte eine verminderte kardiale GRK-Aktivität nachgewiesen werden<sup>84</sup>.

Die Ergebnisse von Deiss et al. (2012) legen die Vermutung nahe, dass RKIP im Herzen nicht in großem Maße als Interaktionspartner und Inhibitor von Raf1 agiert. Diese These konnte mittels Immunoblotverfahren (s. Kap. 3.1.3) weiter gestützt werden. Gleich wie in RKIP<sup>tg</sup>-Tieren unterscheidet sich der Grad der kardialen Phosphorylie-

zung von ERK1/2 als Effektor kinase der durch Raf1 modulierten MAPK-Kaskade zwischen Wildtypmäu sen und RKIP<sup>-/-</sup>-Mäu sen nicht. Fraglich bleibt, ob nach kardialen Stress durch TAC ein Unterschied in der Phosphorylierung und damit Aktivität von ERK1/2 zeigt. Zudem konnte mittels Immunoblot in Mäu seherzen mit einer phosphorylierungsdefizienten Mutante von RKIP, in der Serin153 zu Alanin153 ausgetauscht wurde, eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 gezeigt werden<sup>84</sup>, was den vorher dargestellten, phosphorylierungsabhängigen *Switch*-Mechanismus zur GRK2 unterstreicht.

### 4.3 Phänotypisierung von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäu sen unter physiologischen Rahmenbedingungen

Um die endogene Funktion von RKIP weiter beschreiben zu können, wurden RKIP<sup>-/-</sup>-Mäu se zunächst unter basalen, stressfreien Bedingungen phänotypisiert. Hier zeigte sich an isolierten Kardiomyozyten aus RKIP<sup>-/-</sup>-Mäu sen keine Verschlechterung des Kontraktionsverhaltens auf zellulärer Ebene als auch keine Veränderung der Kalziumkinetik während Systole und Diastole (s. Kap. 3.3). Auch *in vivo* ließ sich zum einen mittels echokardiographisch bestimmter Pumpfunktion keine Veränderung der Auswurfleistung des Herzens feststellen (s. Kap. 3.2.2). Gleichwertige Lungengewichte im Vergleich zu wildtypischen Mäu sen, eine unveränderte Expression von Herzinsuffizienzmarkern und ein nicht vermehrt stattfindendes kardiales *Remodeling* mit unveränderter Fibrosierung und Apoptose des kardialen Gewebes (s. Kap. 3.2.3) sprechen gegen die Entwicklung eines herzinsuffizienten Phänotyps durch den Knockout von RKIP unter stressfreien Rahmenbedingungen. Nachdem in Kap. 3.1.3 der nicht veränderte Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäu seherzen als maßgeblich an der Entwicklung kardialer Hypertrophie beteiligter Kinase dargestellt wurde<sup>96</sup>, ließ sich passend zu diesen Beobachtungen in phänotypischen Untersuchungen zur Hypertrophie (Herzgewicht, Dicke der linksventrikulären Hinterwand, Dicke des interventrikulären Septums, Einzelzellgrößen) kein Unterschied zwischen Wildtypmäu sen und RKIP<sup>-/-</sup>-Tieren feststellen.

Im Einklang mit oben genannten Ergebnissen konnte für Mäu se, die die GRK1/2 (das Zielprotein von RKIP) kardial überexprimieren, bereits gezeigt werden, dass sich unter basalen Ruhebedingungen in Herzkatheteruntersuchungen keine Verschlechterung

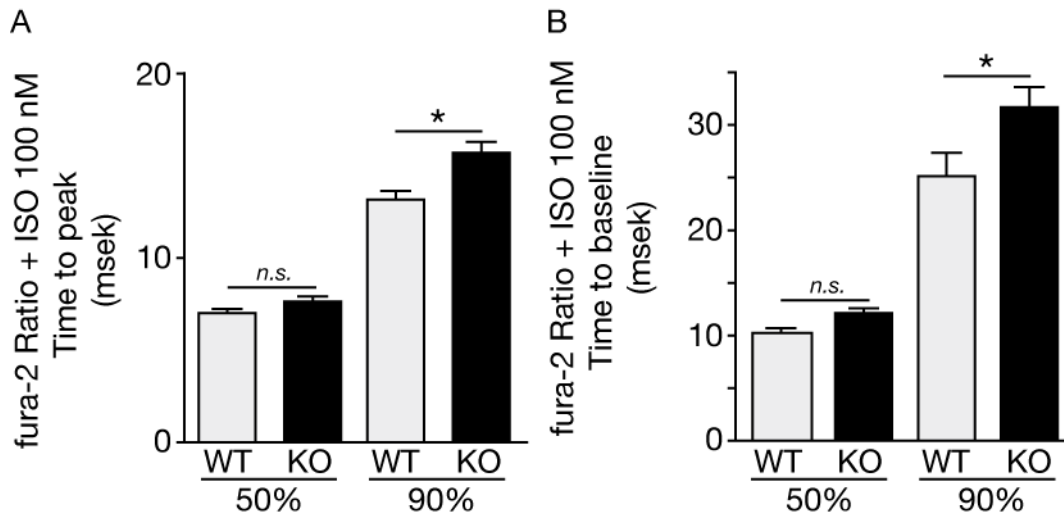
des kardialen Pumpverhaltens feststellen lässt<sup>87</sup>. Zudem konnte an Kardiomyozyten, in denen die Expression von RKIP durch *gene-silencing* mittels siRNA herunter reguliert wurde, ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol kein Unterschied in der intrazellulären cAMP-Konzentration als intrazellulärer Botenstoff  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsignalings gemessen werden. Kongruent dazu zeigte sich in mit siRNA, als auch in mit anti-RKIP-Antikörper behandelten Herzmuskelzellen keine verminderte Kontraktilität ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Isoproterenol<sup>69</sup>. Des Weiteren existieren zahlreiche weitere genetische transgene Tiermodelle, in denen Effekte erst unter dem Einfluss von Stress verstärkt, oder teilweise erst sichtbar werden. Als genetisches Modell, welches unter Ruhebedingungen keine verschlechterte Pumpfunktion zeigt, sei auf Untersuchungen an  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Doppelknockoutmäuse verwiesen. In Herzkatheteruntersuchungen zeigen diese Tiere keine Verminderung der Herzfrequenz noch des mittleren arteriellen Blutdrucks<sup>101</sup>. Und auch Mäuse, die eine *gain-of-function*-Form von ERK2 aufweisen, entwickeln unter Ruhebedingungen keine kardiale Hypertrophie<sup>96</sup>. Aus diesen Gründen wurde die phänotypische Untersuchung von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen auch unter dem Einfluss chronischen Stresses durchgeführt.

#### 4.3 Herzinsuffizienter Phänotyp von RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen unter dem Einfluss von chronischem kardialem Stress

Eine chronische Erhöhung der Nachlast führt in der Maus, als auch im menschlichen Herzen durch chronische,  $\beta$ -adrenerge -unter anderem- PKC-Aktivierung zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz<sup>102,103</sup>. Sowohl in Mäusen, in denen dies durch dreiwöchige TAC erzielt wurde, als auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz lässt sich eine Steigerung der kardialen RKIP-Expression und -Phosphorylierung nachweisen<sup>84</sup>. Zudem führt die Aktivität der PKC dazu, dass RKIP als GRK2-Inhibitor fungiert<sup>68,69</sup>. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass endogenes RKIP bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Art *Rescue*-Funktion erfüllen könnte. Deshalb wurden zum einen Versuche zur Kontraktilität und zur Kalziumkinetik an isolierten Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation gemacht, zum anderen RKIP<sup>-/-</sup>-Tiere nach Induktion einer Herzinsuffizienz durch dreiwöchige TAC phänotypisiert.

Unter dem Einfluss von Isoproterenol, einem  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonist, zeigt sich - wie in Abbildung 36 dargestellt - in isolierten Kardiomyozyten im Gegensatz zur basa-

len Messung ohne Stimulation (s. Kap. 3.3.1) während der Kontraktion eine schnellere Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration, sowie während der Relaxation ein schnellerer Kalziumabtransport.



**Abb. 36:** 50% und 90% der *Time to peak* der *fura-2 ratio* in Millisekunden in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol. **B:** 50% und 90% der *Time to baseline* der *fura-2 ratio* in Millisekunden in Wildtyp- und  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoproterenol.

Kongruent zu diesen Ergebnissen und im Gegensatz zur Situation unter basalen Bedingungen (s. Kap. 3.3.2) zeigt sich auch in den videographischen Untersuchungen der Einzelzellen sowohl bei Betrachtung der Zellgrenzen, als auch der Sarkomerlänge unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation eine Verlangsamung der Kontraktion, als auch der Relaxation der  $RKIP^{-/-}$ -Kardiomyozyten (keine Abbildung; s. Schmid et al.). Die hier beschriebenen Stimulationsversuche an isolierten Kardiomyozyten wurden von Markus Weidenfelder durchgeführt<sup>84</sup>.

Im *in vivo* Modell zeichnet sich ein äquivalentes Bild ab. Im Gegensatz zum basalen Phänotyp zeigt sich unter chronischem Stress in  $RKIP^{-/-}$ -Mäusen ein aggravierter Verlauf einer Herzinsuffizienz. Nach TAC kommt es zu einer massiven Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion, zur Dilatation des linken Ventrikels mit konsekutivem Blutrückstau in die Lungenstrombahn (s. Kap. 3.2.2). BNP als klinischer Marker für den Schweregrad einer Herzinsuffizienz zeigt sich in  $RKIP^{-/-}$ -Tieren erhöht (s. Kap. 3.2.3), außerdem ist ein fortgeschrittenes kardiales Remodeling in diesen Tieren sicht-



bar (s. Kap. 3.2.4). In der Konsequenz der ausgeprägteren Befunde lässt sich eine erhöhte Mortalität der schwer herzinsuffizienten RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse feststellen.

Dieser Herzinsuffizienz-Phänotyp unter chronischem Stress erscheint im Einklang mit GRK1 überexprimierenden Mäusen, welche nach Stimulation mit Isoproterenol eine Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion zeigen<sup>87</sup> und fügt sich ins Gesamtbild zum hyperkontraktilen, nicht herzinsuffizienten Phänotyp von RKIP<sup>tg</sup>-Mäusen (s. Kap. 1.3.2.3).

Allerdings zeigen RKIP<sup>tg</sup>-Tiere auch unter basalen Bedingungen bereits eine verbesserte kardiale Pumpfunktion. In Versuchen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte sich erst nach Transfektion hoher Konzentrationen von RKIP eine Steigerung der PKA-Aktivität durch Isoproterenol<sup>84</sup>. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass für das kardiale Expressionslevel von RKIP ein bestimmter Schwellenwert für die Sensitivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren existiert und stärkt die Theorie, dass RKIP unter physiologischen Bedingungen in zu niedriger Konzentration vorliegt, jedoch unter chronischem kardialen Stress mittels Überexpression und PKC-abhängiger Phosphorylierung einen bedeutenden Feedback Mechanismus erfüllt, welcher in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht mehr greifen kann.

#### 4.4 Die Rolle von RKIP in humanen Herzerkrankungen

Für RKIP gibt es im Menschen bisher neben der gesteigerten kardialen Phosphorylierung und Expression bei Herzinsuffizienzpatienten wenige Erkenntnisse über pathogene Mutationen, oder bestimmte Expressionsmuster. Es stellt sich die Frage im Hinblick auf zukünftige Studien, ob es für RKIP -ähnlich wie für andere kardiale Proteine- Mutationen im Menschen gibt, die für das Fortschreiten oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verantwortlich sein können. Als Beispiel für ein anderes kardiales Protein sei an dieser Stelle Phospholamban (PLN) genannt: Eine fehlende kardiale PLN-Expression, oder die Deletion PLN-R14DEL, bei der es zu einer Deletion von Arginin an Position 14 des PLN-Gens kommt, im Menschen zur Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie mit konsekutiver Herzinsuffizienz<sup>104,105</sup>.

## 4.5 Ausblick

Eine kontraktilitätssteigernde Langzeittherapie der Herzinsuffizienz führt sowohl im klinischen, als auch im experimentellen Modell in den meisten Fällen zu einem verstärkten strukturellen Umbau und einem erhöhten Arrhythmiepotenzial und hat somit unvorteilhafte Folgen für den Herzmuskel und den ganzen Organismus.

Neben einer Steigerung der Aktivität der sarkoplasmatisches Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) durch einen Knockout von Phospholamban<sup>106,107</sup> oder einer SERCA-Überexpression<sup>106,108,109</sup>, wurde unter anderem Ansätze wie die  $\beta$ ARK-ct-abhängige Enthemmung von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen<sup>110</sup> untersucht. Ansätze wie eine chronische Stimulation von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren mit Isoproterenol oder Dobutamin<sup>1,111</sup>, PDE III-Hemmung<sup>1</sup>, PKA-Aktivierung<sup>112</sup>, CaMK II-Aktivierung<sup>113,114</sup>, oder eine Inhibition der Protein Phosphatase 1, die zu einer Verstärkung der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLN und RyR2 führt, haben eine Verschlechterung der Herzfunktion zur Folge<sup>115</sup>. Warum einige Ansätze vielversprechend sind und andere negative Effekte aufzeigen, bedarf weiterer Klärung<sup>84</sup>.

Für RKIP<sup>tg</sup>-Mäuse konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass RKIP für eine balancierte, bzw. eine Art physiologischer Aktivierung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren verantwortlich ist:

Versuche mit  $\beta_1\text{AR}^{-/-}$  und  $\beta_2\text{AR}^{-/-}$ -Mäusen zeigen eine antiapoptotische, antifibrotische und antiarrhythmische  $\beta_2$ -abhängige Wirkung: In  $\beta_2^{-/-}/\text{RKIP}^{\text{tg}}$ -Mäusen (zu RKIP s. Kap. 1.3) stellt sich ein kardiales *Remodeling* in erhöhtem Maße ein, zudem liegt eine verstärkte Phosphorylierung des RyR und eine erhöhte Rate an diastolischen Kalzium-Leckströmen vor<sup>84</sup>. Während  $\beta_1$ -adrenerge Signale zu einer Hyperphosphorylierung des RyR führen, konnte in Versuchen mit mit PTX behandelten Mäusen gezeigt werden, dass die verminderte Phosphorylierung des RyR eine  $G_i$ -abhängige Funktion des  $\beta_2$ -adrenergen Signalwegs ist<sup>84</sup>. Als weiterer  $\beta_2$ -adrenerg vermitteltler antiapoptotischer Signalweg wird eine Aktivierung von PI3/Akt durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des  $\beta_2$ -AR diskutiert<sup>116</sup>.

Somit steht mit RKIP ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine kontraktilitätssteigernde und gleichzeitig kardioprotektive Herzinsuffizienztherapie zur Verfügung<sup>84</sup>.

Dass nachträglich exogen zugeführtes RKIP auch in  $\text{RKIP}^{-/-}$ -Tieren die Entwicklung eines herzinsuffizienten Phänotyps zu verhindern vermag, zeigen Versuche, in denen eine nachträgliche Überexpression von RKIP durch Transfektion mittels *adeno-*

*associated virus serotype 9* (AAV9) erzielt wurde. Die mit AAV9-RKIP behandelten RKIP<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach TAC eine verbesserte Verkürzungsfraction, verringerte linksventrikuläre Dilatation, sowie einen geringeren Blutrückstau in die Lungenstrombahn im Vergleich zur mit AAV9-eGFP behandelten Kontrollgruppe. In mit AAV9-RKIP behandelten Wildtyptieren zeigt sich nach TAC sogar ein hyperkontraktiler Phänotyp<sup>84</sup>. Dieser vielversprechende Applikationsweg via Gentransfer spricht für RKIP als neuartigen Angriffspunkt für die kontraktilitätssteigernde Therapie einer Herzinsuffizienz, für den es interessant wäre, ihn in Zukunft in klinische Studien zu übertragen.

## 5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz, eine der häufigsten chronischen Krankheiten in der westlichen Welt, ist als Folge einer Myokardschädigung durch eine verschlechterte Pumpfunktion des Herzens charakterisiert, die der Körper durch verschiedene Kompensationsmechanismen zur Kontraktilitätssteigerung auszugleichen versucht.

Wichtiger Mechanismus hierfür ist die Kontraktilitäts- und Frequenzsteigerung über  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsignale, welche bei langfristiger Stimulation allerdings zu einer Abnahme der Funktionalität und Minderepression eben dieses Rezeptorsystems, sowie der gleichzeitigen Verschlechterung der Herzinsuffizienz führt. Interessanterweise wird parallel zur verminderten Rezeptorexpression bei Herzinsuffizienzpatienten eine Zunahme der GRK-Aktivität beobachtet. Diese Kinase ist in der Lage,  $\beta$ -adrenerge GPCR-Signale durch Phosphorylierung des membranständigen Rezeptors herunterzuregulieren<sup>117</sup>.

Durch einen PKC-abhängigen *switch* von Raf1 zu GRK2 konnte mit RKIP ein kardialer, endogener Inhibitor der GRK2 identifiziert werden<sup>68,69</sup>. Es wurde *in vitro* und *in vivo* in Mäusen mit myokardialer Überexpression von RKIP gezeigt, dass RKIP fähig ist, die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen zu verbessern, negative kardiale Langzeitfolgen wie eine Verschlechterung der Insuffizienz, *Remodeling*-Prozesse wie Zunahme der Fibrosierung und eine gesteigerte Apoptoserate, sowie kardiale Rhythmusstörungen protektiv zu beeinflussen<sup>84</sup>.

Um die endogene Rolle von RKIP weiter zu erörtern, wurde in dieser Arbeit der Knockout von RKIP unter basalen Bedingungen, als auch nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) untersucht. Zur Untersuchung physiologischer Parameter wie der Verkürzungsfraktion, oder dem linksventrikulärem diastolischen Durchmesser wurden echokardiographische Verfahren herangezogen. In diesen Untersuchungen zeigte sich nach dreiwöchiger TAC eine Verschlechterung der Pumpfunktion, sowie eine verstärkte Dilatation des linken Ventrikels in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Gestützt wurden diese Ergebnisse durch einen erhöhten pulmonalen Blutrückstau in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nach chronischer Druckbelastung.

Zudem wurde an isolierten Kardiomyozyten die Kinetik von Kalzium als für die Kontraktion verantwortlichen Botenstoff durch intrazelluläre Fluoreszenz-Echtzeit-

Messungen, sowie die Kontraktion und Relaxation auf Zell- und Sarkomerebene durch ein optisches Kamerasystem untersucht. Hier zeigte sich ohne den Einfluss  $\beta$ -adrenerger Stimulantien äquivalent zum basalen Phänotyp dieser Tiere in RKIP<sup>-/-</sup>-Kardiomyozyten keine Veränderung der Kalzium-Kinetik, sowie der Kontraktion und Relaxation auf Zell- und Sarkomerebene.

Des Weiteren wurden mittels *realtime* PCR die Expressionslevels von Insuffizienzmarkern wie BNP und ANP, sowie von Kollagen 3 bestimmt. Der Grad der Fibrosierung wurde zusätzlich durch Quantifizierung der fibrosierten Areale in histologischen Querschnitten untersucht. Apoptotische Veränderungen wurden mittels TUNEL-Assay auf histologischer Ebene bestimmt. In all diesen Untersuchungen zeigte sich ein fortgeschrittenes kardiales *Remodeling* in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nach TAC im Vergleich zu Wildtyptieren. Hand in Hand mit dem Bild einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz in RKIP<sup>-/-</sup>-Mäusen nach TAC konnte zudem in diesen Tieren eine gesteigerte Mortalität nach chronischer Hochdruckbelastung festgestellt werden.

In Kombination mit den protektiven Eigenschaften einer kardialen RKIP-Überexpression, sowie dem positiven Effekt einer retroviralen RKIP-Transfektion (s. Kap. 4.5) sprechen diese Ergebnisse für RKIP als einen interessanten körpereigenen Angriffspunkt für die kontraktilitätssteigernde Therapie der Herzinsuffizienz, den es in weiteren klinischen Studien zu untersuchen gilt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. McMurray, J.J., *et al.* 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. *European journal of heart failure* **14**, 803-869 (2012).
2. Herold, G. *Innere Medizin*, (Herold, Köln, 2016).
3. Bristow, M.R., *et al.* Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *The New England journal of medicine* **307**, 205-211 (1982).
4. Olivetti, G., *et al.* Apoptosis in the failing human heart. *The New England journal of medicine* **336**, 1131-1141 (1997).
5. Bjarnadottir, T.K., *et al.* Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**, 263-273 (2006).
6. Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 639-650 (2002).
7. Foord, S.M., *et al.* International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* **57**, 279-288 (2005).
8. Bockaert, J. & Pin, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* **18**, 1723-1729 (1999).
9. Cherezov, V., *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265 (2007).
10. Trzaskowski, B., *et al.* Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry* **19**, 1090-1109 (2012).
11. Huang, C.C. & Tesmer, J.J. Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs. *The Journal of biological chemistry* **286**, 7715-7721 (2011).
12. Ritter, S.L. & Hall, R.A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 819-830 (2009).
13. Oldham, W.M. & Hamm, H.E. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly reviews of biophysics* **39**, 117-166 (2006).
14. Simon, M.I., Strathmann, M.P. & Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808 (1991).
15. Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J. & Hosey, M.M. Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**, 10361-10370 (1999).
16. McDonald, T.F., Pelzer, S., Trautwein, W. & Pelzer, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiological reviews* **74**, 365-507 (1994).
17. Marx, S.O., *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**, 365-376 (2000).
18. Sulakhe, P.V. & Vo, X.T. 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. *Molecular and cellular biochemistry* **149-150**, 103-126 (1995).
19. Kunst, G., *et al.* Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circulation research* **86**, 51-58 (2000).
  20. Simmerman, H.K. & Jones, L.R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* **78**, 921-947 (1998).
  21. Biel, M., Schneider, A. & Wahl, C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends in cardiovascular medicine* **12**, 206-212 (2002).
  22. Hoffmann, C., Leitz, M.R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M.J. & Klotz, K.N. Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **369**, 151-159 (2004).
  23. Brodde, O.E. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacology & therapeutics* **60**, 405-430 (1993).
  24. Brodde, O.E. & Michel, M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews* **51**, 651-690 (1999).
  25. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M.J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7059-7064 (1999).
  26. Bisognano, J.D., *et al.* Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 817-830 (2000).
  27. Marks, A.R., Reiken, S. & Marx, S.O. Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation* **105**, 272-275 (2002).
  28. Chopra, N., *et al.* Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca<sup>2+</sup> release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7636-7641 (2009).
  29. Shan, J., *et al.* Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 4388-4398 (2010).
  30. Milano, C.A., *et al.* Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* **264**, 582-586 (1994).
  31. Akhter, S.A., *et al.* Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12100-12105 (1997).
  32. Liggett, S.B., *et al.* Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-1714 (2000).
  33. Daaka, Y., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91 (1997).

34. Chakir, K., *et al.* G $\alpha$ -biased beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor signaling from restoring synchronous contraction in the failing heart. *Science translational medicine* **3**, 100ra188 (2011).
35. Luttrell, L.M., *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta<sub>2</sub> adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661 (1999).
36. Kuschel, M., *et al.* G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22048-22052 (1999).
37. Orchard, C. & Brette, F. t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovascular research* **77**, 237-244 (2008).
38. Nikolaev, V.O., *et al.* Beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* **327**, 1653-1657 (2010).
39. Lohse, M.J. & Engelhardt, S. Protein kinase a transgenes: the many faces of cAMP. *Circulation research* **89**, 938-940 (2001).
40. Tavernier, G., *et al.* beta<sub>3</sub>-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta<sub>3</sub>-adrenergic receptor. *Cardiovascular research* **59**, 288-296 (2003).
41. Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D. & Le Marec, H. Functional beta<sub>3</sub>-adrenoceptor in the human heart. *The Journal of clinical investigation* **98**, 556-562 (1996).
42. Brixius, K., *et al.* Beta<sub>3</sub>-adrenergic eNOS stimulation in left ventricular murine myocardium. *Can J Physiol Pharmacol* **84**, 1051-1060 (2006).
43. Cheng, H.J., *et al.* Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circulation research* **89**, 599-606 (2001).
44. Gauthier, C., Langin, D. & Balligand, J.L. Beta<sub>3</sub>-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends in pharmacological sciences* **21**, 426-431 (2000).
45. Kohout, T.A., *et al.* Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* **104**, 2485-2491 (2001).
46. Devic, E., Xiang, Y., Gould, D. & Kobilka, B. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Molecular pharmacology* **60**, 577-583 (2001).
47. Moens, A.L., *et al.* Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta<sub>3</sub>-adrenoreceptor. *Journal of molecular and cellular cardiology* **47**, 576-585 (2009).
48. Gaudin, C., *et al.* Overexpression of G(S-Alpha) Protein in the Hearts of Transgenic Mice. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 1676-1683 (1995).
49. Iwase, M., *et al.* Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression. *Circulation research* **78**, 517-524 (1996).
50. Strasser, R.H., Sibley, D.R. & Lefkowitz, R.J. A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* **25**, 1371-1377 (1986).
51. Sato, P.Y., Chuprun, J.K., Schwartz, M. & Koch, W.J. The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiological reviews* **95**, 377-404 (2015).



52. Dzimir, N., Muiya, P., Andres, E. & Al-Halees, Z. Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *European journal of pharmacology* **489**, 167-177 (2004).
53. Monto, F., *et al.* Different expression of adrenoceptors and GRKs in the human myocardium depends on heart failure etiology and correlates to clinical variables. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **303**, H368-376 (2012).
54. Aguero, J., *et al.* Correlation between beta-adrenoceptors and G-protein-coupled receptor kinases in pretransplantation heart failure. *Transplantation proceedings* **40**, 3014-3016 (2008).
55. Voigt, C., Holzapfel, H.P., Meyer, S. & Paschke, R. Increased expression of G-protein-coupled receptor kinases 3 and 4 in hyperfunctioning thyroid nodules. *The Journal of endocrinology* **182**, 173-182 (2004).
56. Benovic, J.L., Mayor, F., Jr., Somers, R.L., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase. *Nature* **321**, 869-872 (1986).
57. Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 2797-2801 (1986).
58. Strasser, R.H., Benovic, J.L., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. Beta-agonist- and prostaglandin E1-induced translocation of the beta-adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate cyclase-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 6362-6366 (1986).
59. Day, P.W., Carman, C.V., Sterne-Marr, R., Benovic, J.L. & Wedegaertner, P.B. Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family. *Biochemistry* **42**, 9176-9184 (2003).
60. Shukla, A.K., *et al.* Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* **512**, 218-222 (2014).
61. Bernier, I., Tresca, J.P. & Jolles, P. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochimica et biophysica acta* **871**, 19-23 (1986).
62. Banfield, M.J., Barker, J.J., Perry, A.C. & Brady, R.L. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure* **6**, 1245-1254 (1998).
63. Theroux, S., *et al.* Raf kinase inhibitory protein knockout mice: expression in the brain and olfaction deficit. *Brain research bulletin* **71**, 559-567 (2007).
64. Hickox, D.M., *et al.* Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biology of reproduction* **67**, 917-927 (2002).
65. Zhang, Y., *et al.* Promotion of cellular migration and apoptosis resistance by a mouse eye-specific phosphatidylethanolamine-binding protein. *International journal of molecular medicine* **19**, 55-63 (2007).
66. Wang, X., *et al.* A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45855-45864 (2004).

67. Guo, C., Yi, C., Peng, Y., Wen, Y. & Lin, D. Solution structure and backbone dynamics of human Raf-1 kinase inhibitor protein. *Biochemical and biophysical research communications* **438**, 129-132 (2013).
68. Deiss, K., Kisker, C., Lohse, M.J. & Lorenz, K. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2. *The Journal of biological chemistry* **287**, 23407-23417 (2012).
69. Lorenz, K., Lohse, M.J. & Quitterer, U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* **426**, 574-579 (2003).
70. Corbit, K.C., *et al.* Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13061-13068 (2003).
71. Yeung, K., *et al.* Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**, 173-177 (1999).
72. Eves, E.M., *et al.* Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Molecular cell* **23**, 561-574 (2006).
73. Mercurio, F., *et al.* IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860-866 (1997).
74. Al-Mulla, F., *et al.* Raf kinase inhibitor protein RKIP enhances signaling by glycogen synthase kinase-3beta. *Cancer research* **71**, 1334-1343 (2011).
75. Klysik, J., Theroux, S.J., Sedivy, J.M., Moffit, J.S. & Boekelheide, K. Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cellular signalling* **20**, 1-9 (2008).
76. Morecroft, I., *et al.* Mice lacking the Raf-1 kinase inhibitor protein exhibit exaggerated hypoxia-induced pulmonary hypertension. *British journal of pharmacology* **163**, 948-963 (2011).
77. Moffit, J.S., Boekelheide, K., Sedivy, J.M. & Klysik, J. Mice lacking Raf kinase inhibitor protein-1 (RKIP-1) have altered sperm capacitation and reduced reproduction rates with a normal response to testicular injury. *Journal of andrology* **28**, 883-890 (2007).
78. Thongboonkerd, V. & Klein, J.B. Practical bioinformatics for proteomics. *Contributions to nephrology* **141**, 79-92 (2004).
79. Kikkawa, R., Koya, D. & Haneda, M. Progression of diabetic nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **41**, S19-21 (2003).
80. Fu, Z., *et al.* Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 878-889 (2003).
81. Chatterjee, D., *et al.* RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 17515-17523 (2004).
82. Yeung, K.C., *et al.* Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology* **21**, 7207-7217 (2001).
83. Lorenz, K., Schmitt, J.P., Vidal, M. & Lohse, M.J. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**, 2351-2355 (2009).
84. Schmid, E., *et al.* Cardiac RKIP induces a beneficial beta-adrenoceptor-dependent positive inotropy. *Nature medicine* **21**, 1298-1306 (2015).

85. Matkovich, S.J., *et al.* Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circulation research* **99**, 996-1003 (2006).
86. Koch, W.J., Inglese, J., Stone, W.C. & Lefkowitz, R.J. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *The Journal of biological chemistry* **268**, 8256-8260 (1993).
87. Koch, W.J., *et al.* Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* **268**, 1350-1353 (1995).
88. Lodowski, D.T., Pitcher, J.A., Capel, W.D., Lefkowitz, R.J. & Tesmer, J.J. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* **300**, 1256-1262 (2003).
89. deAlmeida, A.C., van Oort, R.J. & Wehrens, X.H. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp* (2010).
90. De Keulenaer, G.W., *et al.* Identification of IEX-1 as a biomechanically controlled nuclear factor-kappaB target gene that inhibits cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* **90**, 690-696 (2002).
91. Rockman, H.A., *et al.* Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8277-8281 (1991).
92. Smith, P.K., *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
93. Eichmann, T., *et al.* The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *The Journal of biological chemistry* **278**, 8052-8057 (2003).
94. Buitrago, M., *et al.* The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nature medicine* **11**, 837-844 (2005).
95. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry* **250**, 4007-4021 (1975).
96. Lorenz, K., Schmitt, J.P., Schmitteckert, E.M. & Lohse, M.J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nature medicine* **15**, 75-83 (2009).
97. Konstam, M.A., Kramer, D.G., Patel, A.R., Maron, M.S. & Udelson, J.E. Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**, 98-108 (2011).
98. Patten, R.D. & Konstam, M.A. Ventricular remodeling and the renin angiotensin aldosterone system. *Congest Heart Fail* **6**, 187-192 (2000).
99. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* **260**, 3440-3450 (1985).
100. Bals, S., Bechem, M., Paffhausen, W. & Pott, L. Spontaneous and experimentally evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-transients in cardiac myocytes measured by means of a fast Fura-2 technique. *Cell Calcium* **11**, 385-396 (1990).
101. Rohrer, D.K., Chruscinski, A., Schauble, E.H., Bernstein, D. & Kobilka, B.K. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* **274**, 16701-16708 (1999).
102. Braz, J.C., *et al.* PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature medicine* **10**, 248-254 (2004).

103. Hambleton, M., *et al.* Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* **114**, 574-582 (2006).
104. Haghghi, K., *et al.* Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *The Journal of clinical investigation* **111**, 869-876 (2003).
105. Haghghi, K., *et al.* A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1388-1393 (2006).
106. Kairouz, V., Lipskaia, L., Hajjar, R.J. & Chemaly, E.R. Molecular targets in heart failure gene therapy: current controversies and translational perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1254**, 42-50 (2012).
107. Slack, J.P., *et al.* The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging. *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**, 1031-1040 (2001).
108. Greenberg, B., *et al.* 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). *JACC. Heart failure* **2**, 84-92 (2014).
109. Kranias, E.G. & Hajjar, R.J. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation research* **110**, 1646-1660 (2012).
110. Volkers, M., *et al.* The inotropic peptide betaARKct improves betaAR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through G(betagamma)-mediated L-type calcium current disinhibition. *Circulation research* **108**, 27-39 (2011).
111. Tacon, C.L., McCaffrey, J. & Delaney, A. Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive care medicine* **38**, 359-367 (2012).
112. Antos, C.L., *et al.* Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circulation research* **89**, 997-1004 (2001).
113. Lehnart, S.E., Maier, L.S. & Hasenfuss, G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart failure reviews* **14**, 213-224 (2009).
114. Anderson, M.E., Brown, J.H. & Bers, D.M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **51**, 468-473 (2011).
115. El-Armouche, A., *et al.* Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy. *Cardiovascular research* **80**, 396-406 (2008).
116. Singh, K., Xiao, L., Remondino, A., Sawyer, D.B. & Colucci, W.S. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Journal of cellular physiology* **189**, 257-265 (2001).
117. Lohse, M.J., Engelhardt, S. & Eschenhagen, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circulation research* **93**, 896-906 (2003).

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen Beteiligten zu bedanken, die mich sowohl in der experimentellen Phase meiner Dissertation, als auch während der Zeit der Niederschrift unterstützten.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Lohse für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg anzufertigen.

Ganz besonderer Dank gilt zudem Frau Prof. Dr. Kristina Lorenz für die sehr gute und immer unterstützende Betreuung über die gesamte Zeit meiner Arbeit am Institut und auch darüber hinaus.

Herrn PD Dr. Peter Nordbeck danke ich für seine sofortige Bereitschaft, diese Arbeit als Korreferent zu begutachten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Lorenz bedanken, die mir während meiner Zeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und ohne die es mir absolut nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit anzufertigen.

Insbesondere den technischen Assistentinnen Nadine Yurdagül-Hemmerich, Martina Fischer, Julia Fischer und Marianne Babl, sowie ganz besonders meiner Laborkollegin Evelyn Schmid möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und viele nützliche Tipps während der Zeit im Labor Danke sagen. Vielen, vielen Dank!

Abschließend gilt mein großer Dank meinen Freunden und meiner Familie, die während dieser Arbeit und auch allen anderen Zeiten hinter mir stehen und mir immer eine große und wichtige Stütze sind. Auch Euch: Danke!