

**Aus dem Institut für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. Kristina Lorenz**

**Kontraktionsverhalten neonataler Rattenkardiomyozyten bei Überexpression
phosphorylierungsdefizienter RKIP Mutanten S51/S52**

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

vorgelegt von

Florian Schäfer

aus Mühlenbach

Karlsruhe, Mai 2019

Referentin:	Prof. Dr. Kristina Lorenz
Korreferent/Korreferentin:	PD Dr. Peter Nordbeck
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2020

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Pathologie der Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Kompensationsmechanismen	2
1.1.2	Ausbruch aus dem <i>Circulus vitiosus</i> der Herzinsuffizienz	5
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	7
1.3	Heterotrimere G-Proteine	7
1.4	Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion	8
1.4.1	Effektormoleküle der heterotrimeren G-Proteine	9
1.5	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	11
1.5.1	Die Familien der GRK	12
1.5.2	Therapeutische Ansätze durch Hemmung der GRK2	12
1.6	Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP)	14
1.7	Raf-MEK-ERK Kaskade	15
1.8	Kontraktion von Kardiomyozyten	17
1.8.1	Der Querbrückenzyklus	18
1.9	Ziel dieser Arbeit	23
2	Material	24
2.1	Verbrauchsmaterialien	24
2.2	Kits	24
2.3	Geräte	24
2.4	Substanzen	25
3	Methoden	27
3.1	Zellkultur	27
3.1.1	Präparation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten	27
3.1.2	Deckgläser	29
3.1.3	12-Näpfchen Platte	29
3.1.4	96-Näpfchen Platte	30
3.2	Herstellung der Adenoviren und Transduktion NRCM	30
3.2.1	Transduktion	30
3.2.2	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	31
3.2.3	Proteinreinigung	32
3.3	Quantifizierung der Proteinexpression	33
3.3.1	Probengewinnung	33
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
3.3.4	Transfer von Proteinen (Western Blot)	35
3.3.5	Coomassie Färbung	36
3.3.6	Immundetektion immobilisierter Proteine	36
3.3.7	Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	38
3.4	Messung der Spontankontraktilität von NRCM	38

3.5	Photometrische Messung des intrazellulären Calciumspiegels.....	39
3.5.1	Versuchsaufbau	42
3.5.2	Erfassung intrazellulärer Calciumspiegel.....	42
	Kurvenparameter	45
3.6	Statistik	45
3.7	<i>In vitro</i> Kinase Assay	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Überblick	48
4.2	Kontraktilitätsmessungen	48
4.2.1	Expressionskontrolle und Infektionsbedingungen	49
4.2.2	RKIP Überexpression erhöht Kontraktionen nach Isoproterenolstimulation	50
4.2.3	RKIP erhöht die Ca ²⁺ -Freisetzung und beschleunigt die Ca ²⁺ -Wiederaufnahme ..	51
4.3	RKIP ^{S51V} und RKIP ^{S52V} zeigen keinen Einfluss auf die Kontraktilität	52
4.4	<i>In Vitro</i> Kinase Assay	56
5	Diskussion	60
5.1	Regulation von Proteinen durch Phosphorylierung.....	60
5.2	Regulation von RKIP durch Phosphorylierung	61
5.3	Calciumcycling.....	62
5.4	Ausblick.....	64
6	Zusammenfassung	65
7	Anhang	66
7.1	Abkürzungsverzeichnis	66
7.2	Abbildungsverzeichnis	68
7.3	Tabellenverzeichnis	69
7.4	Pufferzusammensetzungen	70
7.5	Literaturverzeichnis	71
8	Anhang	83
8.1	Eidesstattliche Erklärung	83
8.2	Danksagung	84
8.3	Curriculum vitae	85

1 Einleitung

Seit 2006 ist Herzinsuffizienz die häufigste Hauptdiagnose bei Hospitalisierungen in Deutschland [Neumann, Biermann et al. 2009, #1]. Neben einer niedrigen Lebensqualität weist die Erkrankung eine ausgesprochen schlechte Prognose auf. So beträgt die Fünfjahresüberlebensrate nur etwa 50 %. Ein Wert, der mit vielen malignen Erkrankungen vergleichbar ist [Townsend, Nichols et al. 2015, #2]. Aufgrund einer steigenden Lebenserwartung sowie höherer Überlebensraten nach akuten Myokardinfarkten gilt ein Anstieg der Prävalenz der Herzinsuffizienz in den nächsten Jahren als wahrscheinlich [Savarese and Lund 2017, #3].

1.1 Pathologie der Herzinsuffizienz

Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (*ESC*) definiert Herzinsuffizienz als komplexes Syndrom, in dessen Verlauf pathologische Veränderungen der Herzstruktur oder -funktion dazu führen, dass metabolische Prozesse eines Organismus nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können [McMurray, Adamopoulos et al. 2012, #4]. Ist das Herz nicht in der Lage den Sauerstoffbedarf des Körpers durch Bereitstellen eines ausreichenden Herzzeitvolumens (HZV) zu decken, kann dies entweder Folge einer verminderten Füllung der Ventrikel, beispielsweise aufgrund einer verminderten Dehnbarkeit des Myokards, sein oder eine verminderte Pumpleistung, insbesondere des linken Ventrikelmyokards, ist ursächlich. Im ersten Fall wird die Herzinsuffizienz bei erhaltener Pumpleistung als diastolische Herzinsuffizienz bezeichnet, ansonsten handelt es sich um eine systolische Herzinsuffizienz [Dennis L. Kasper 2018, #5].

In den meisten Fällen entwickelt sich eine Herzinsuffizienz zunächst asymptomatisch. Nach dem ersten Auftreten von Symptomen ist der weitere Krankheitsverlauf von einer zunehmenden Verschlechterung des Allgemeinzustandes, progredient eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit und Lebensqualität bis hin zur kardialen Dekompensation und Hospitalisierung geprägt.

Während das gesunde Herz bei abnehmender Durchblutung peripherer Organe mit einer erhöhten Auswurffraktion und einer Steigerung der Kontraktionskraft des Myokards reagiert und so die Versorgung des Körpers wiederherstellt, kann ein insuffizientes Herz die benötigte zusätzliche Kontraktion nicht aufbringen [Strickman 1987, #6], [Cohn 1973, #7]. Untersuchungen am geschädigten Herzen konnten zeigen, dass erhöhte Druck- und

Volumenbelastung über einen längeren Zeitraum zu irreversiblen Umbauprozessen (*Remodeling*) am Herzen führen, welche die Herzleistung dauerhaft reduzieren [Connelly, McLaughlin et al. 1991, #8], [Pfeffer, Pfeffer et al. 1985, #9], [Grossman, Jones et al. 1975, #10]. Einem Umbauprozess, der im insuffizienten Herzen stattfindet, geht der Tod von kontraktilen Herzmuskelzellen voraus. Kardiomyozyten sterben durch ischämische Bedingungen, beispielsweise während eines Herzinfarktes, in Folge von Alkoholmissbrauch oder durch Einnahme zytotoxischer Substanzen, durch Parasitenbefall, beispielsweise *Morbus Chagas* oder im Rahmen von Infektionskrankheiten wie einer Virusmyokarditis. Auch eine chronische Überbelastung des Herzens durch Bluthochdruck oder die Folgen eines Herzklappenfehlers können das Herz schädigen [Packer 1992, #11]. Bei anhaltendem hämodynamischem Stress auf das Myokard ist eine Hypertrophie der Ventrikel zu beobachten. Deren Form zeigt sich zunächst konzentrisch, bei fortschreitender Dilatation mehr kugelförmig. Bei weiterer Progression ist die Kompensation nicht mehr ausreichend und die veränderte Morphologie der Ventrikel führt zu einem zunehmenden Funktionsverlust und damit zur Ausprägung der Symptomatik.

1.1.1 Kompensationsmechanismen

Mit dem kardialen *Remodeling* gehen Veränderungen des endogenen neurohormonalen Systems einher, darunter das adrenerge- sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron System [Mudd and Kass 2008, #12]. Eine Herzinsuffizienz entwickelt sich erst wenn hämodynamische und hormonelle Kompensationsmechanismen überfordert oder erschöpft sind [Packer 1992, #11].

Kompensationsmechanismen werden eingeleitet, wenn die Auswurfraction während der Systole abnimmt. Somit gilt eine linksventrikuläre Dysfunktion als notwendige, wenn auch nicht hinreichende, Voraussetzung für die Ausbildung des Syndroms Herzinsuffizienz. Die reduzierte Pumpleistung des linken Ventrikels wird durch Kompensationsmechanismen innerhalb physiologischer Grenzen moduliert, so dass die Funktionstüchtigkeit des Herzens oftmals erhalten oder nur in geringem Umfang reduziert wird [Mann 1999, #13], [Armstrong 2000, #14], [Heusch, Libby et al. 2014, #15].

Ein solcher Kompensationsmechanismus ist der Frank-Starling-Mechanismus: in Folge der verminderten Ejektionsfraction erhöht sich die Wandspannung des Ventrikels in der Diastole. Die verbliebenen funktionsfähigen Kardiomyozyten reagieren auf diese erhöhte Vordehnung mit einer erhöhten Kontraktion [Hanft, Korte et al. 2008, #16], [Frank 1959, #17], [Patterson

and Starling 1914, #18]. Eine verminderte Ejektionsfraktion aktiviert den Sympathikus, wodurch vermehrt Noradrenalin ausgeschüttet wird. In welchem Ausmaß Adrenalin und Noradrenalin die Progression einer Herzinsuffizienz beeinflussen, wird seit Jahrzehnten erforscht. Diskutiert wurden zwei Pathologiemechanismen: zum einen könnte sich die Aktivierung des sympathischen Nervensystems auf das hämodynamische System betroffener Patienten auswirken, da eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems die Vasokonstriktion aktiviert und die Wasser- sowie Natriumretention fördert [Shchekochikhin, Al Ammary et al. 2013, #19],[Schrier 1990, #20], [Connelly, McLaughlin et al. 1991, #8]. Zum anderen könnten hohe Konzentrationen von Noradrenalin über längere Zeit Kardiomyozyten direkt schädigen [Mann, Kent et al. 1992, #21]. Der systemische Anstieg des Noradrenalinspiegels beeinflusst speziell Herz und Niere besonders stark [Fu, Chi et al. 2004, #22], [Hasking, Esler et al. 1986, #23]. Eine kausale Verbindung zwischen der Aktivierung des sympathischen Nervensystems am Herzen und dem Auftreten von Arrhythmien gilt als wahrscheinlich [Meredith, Broughton et al. 1991, #24]. Der Noradrenalin-Plasmaspiegel kann als Prognosemarker für die chronische Herzinsuffizienz herangezogen werden [Cohn, Levine et al. 1984, #25]. Sowohl Adrenalin als auch Noradrenalin binden an Rezeptoren auf der Kardiomyozytenoberfläche, den β -Rezeptoren, wodurch Herzfrequenz und Kontraktionskraft des Herzens in kurzer Zeit gesteigert werden [Kaumann, Hall et al. 1989, #26].

Obwohl diese beiden Kompensationsmechanismen, Frank-Starling-Mechanismus und die Ausschüttung von Stresshormonen, die Kontraktionskraft des Herzens enorm steigern können, stellt ihre Aktivierung zugleich ein erhebliches Risiko dar. Adrenalin und Noradrenalin erhöhen den peripheren Gefäßwiderstand durch Stimulation der glatten Muskulatur. [Ledoux, Gee et al. 2003, #27].

Sowohl der gesteigerte periphere Widerstand als auch die Ventrikeldilatation setzen die Kardiomyozyten in der Systole einem erheblichen mechanischen Stress aus. Langfristig sind strukturelle Schäden und ein erhöhter Energieverbrauch die Folge [Connelly, McLaughlin et al. 1991, #8]. Bei anhaltend hohem Plasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin ist am Herzen eine Desensibilisierung zu beobachten – ein Kontrollmechanismus, wodurch die Empfindlichkeit von β -Rezeptoren gegenüber Adrenalin und Noradrenalin herabgesetzt wird [Sibley and Lefkowitz 1985, #28]. Dadurch wirken bei chronischer Herzinsuffizienz adrenerge Hormone am betroffenen Herzen immer weniger inotrop [Colucci, Denniss et al. 1988, #29]. Ein *Circulus vitiosus* ist die Folge [Eschenhagen 2008, #30].

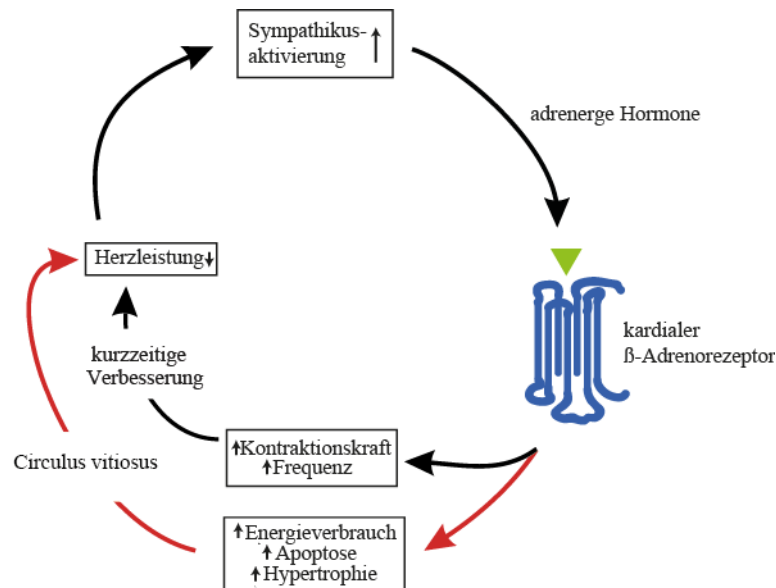


Abbildung 1: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz

Abwärtsspirale der Herzinsuffizienz: eine Verminderung der kardialen Pumpleistung führt zu einer Aktivierung des Sympathikus. Die Ausschüttung adrenerger Hormone aktiviert in kurzer Zeit einen Mechanismus, der die Versorgung lebenswichtiger Organe sicherstellt indem der Blutfluss an Muskeln, Haut, Niere und dem Verdauungstrakt reduziert und die Herzfrequenz und –schlagkraft gesteigert wird. Eine anhaltende Aktivierung des Sympathikus führt allerdings zu einer Erhöhung des peripheren Widerstands wodurch die Nachlast steigt. Zudem führt eine dauerhafte Stimulation der Kardiomyozyten zu unerwünschten Nebeneffekten wie einem überproportionalen Anstieg des Energiebedarfs, Apoptose, Fibrose sowie Hypertrophie. Grafik modifiziert nach [Eschenhagen 2008, #30].

1.1.1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Eine verminderte Auswurfleistung des Herzens führt zu einer reduzierten Durchblutung der Niere. Dadurch wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert [Dendorfer, Thornagel et al. #31], [Hofbauer, Zschiedrich et al. 1976, #32], indem Zellen des juxtaglomerulären Apparates in der Niere Renin freisetzen [Laragh and Sealey 1991, #33]. Die Synthese von Renin wird wesentlich durch den vorliegenden Blutdruck bestimmt, welcher durch Barorezeptoren am *Vas afferens* erfasst wird [Brewster and Perazella 2004, #34]. So reagiert die Niere als peripheres Organ auf einen sinkenden Blutdruck in Folge einer reduzierten Ejektionsfraktion des Herzens. Die Aspartylprotease Renin katalysiert die Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Letzteres wird vom *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), einer Dipeptidylcarboxypeptidase, in das wirksamere Angiotensin II überführt [Skeggs, Marsh et al. 1954, #35] und erhöht als starker Vasokonstriktor den peripheren Widerstand [Fountain JH 2020, #36], wodurch dem sinkenden Blutdruck entgegengewirkt wird. Zudem begünstigt Angiotensin II die Freisetzung von Katecholaminen in peripheren sympathischen Neuronen [Dendorfer, Thornagel et al. 2002, #31].

Durch Aktivierung von Angiotensinrezeptoren in der *Zona Glomerulosa* wird die Synthese von Aldosteron in der Nebennierenrinde aktiviert [Laragh, Angers et al. 1960, #37], [Brewster

and Perazella 2004, #34], welches in der Niere zur vermehrten Resorption von Natrium und Wasser führt und damit Einfluss auf den körpereigenen Volumenhaushalt nimmt. Die Steigerung des Blutvolumens ist ein weiterer Mechanismus um den Blutdruck zu steigern. Ein gesteigertes Blutvolumen kann allerdings zur vermehrten Entstehung von Ödemen beitragen.

1.1.1.2 Natriuretische Peptide

Ein Inhibitor des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems stellt das im Herzen exprimierte Peptidhormon Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) dar [Anderson, Struthers et al. 1986, #38]. Das ANP, auch als Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF) bezeichnet, wird in den Kardiomyozyten des Atriums, bei Vorliegen einer Herzhypertrophie auch in den Kardiomyozyten des Ventrikels [Hunt, Espiner et al. 1996, #39] synthetisiert. ANP vermindert die Freisetzung von Renin in der Niere und Aldosteron in der Nebennierenrinde [Hunt, Espiner et al. 1996, #39]. Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen eine erhöhte Konzentration von ANP im Blutplasma [Ruskoaho 2003, #40].

1.1.2 Ausbruch aus dem *Circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz

Ein Meilenstein beim Versuch den *Circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz zu durchbrechen, konnte mit dem Einsatz von β -Blockern erreicht werden. β -Blocker sind Medikamente, die mit den Stresshormonen Adrenalin und Noradrenalin um Bindungsstellen an deren Rezeptoren - unter anderem am Herzen - konkurrieren. Waagstein *et al.* berichteten bereits 1975 über ihre Erfahrungen beim Einsatz von β -Blockern an Patienten, die mit Herzinsuffizienz diagnostiziert wurden [Waagstein, Hjalmarson et al. 1975, #41]. Zu dieser Zeit galt der Einsatz von β -Blockern bei Herzinsuffizienz als kontraindiziert. Stattdessen suchten die meisten Wissenschaftler nach einem Medikament, welches die Kontraktilität des Herzens erhöht. Dieses Ziel erwuchs der Vorstellung die Hauptursache der Herzinsuffizienz zu therapieren: die eingeschränkte Pumpleistung des Herzens [Eschenhagen 2008, #30]. β -Blocker hingegen schienen bei Herzinsuffizienz die völlig falschen Wirkungen zu vermitteln. Tatsächlich reduzieren sie die Pumpleistung des Herzens, können ein akutes Herzversagen auslösen und verengen Blutgefäße eher als sie zu weiten. Der Vorschlag, β -Blocker in der Therapie herzinsuffizienter Patienten einzusetzen, stieß in Fachkreisen auf starke Ablehnung [Eschenhagen 2008, #30].

Viele Jahre und zahlreiche klinische Studien später wurde klar, dass Medikamente, die ausschließlich die Inotropie steigern, trotz ihres unbestrittenen kurzzeitigen Nutzens bei längerer Anwendung die Sterblichkeitsrate erhöhen. Obwohl β -Blocker unmittelbar nach

Einnahme die kardiale Kontraktilität schwächen, nimmt die Sterblichkeitsrate bei Patienten, die β -Blocker einnehmen und deren Dosis langsam steigern, ab. Nach einigen Monaten kann sogar eine Zunahme der kardialen Kontraktilität beobachtet werden [Mann, Kent et al. 1992, #21], [Packer, Bristow et al. 1996, #42], [Bristow 1984, #43]. Wie sind diese im ersten Moment paradox erscheinenden Befunde zu erklären?

Das Herz ist ein biologisches System, das sich an anhaltende Stimulation und deren Wegfall anpasst [Eschenhagen 2008, #30]. Nach einem Abfall der kardialen Pumpleistung, beispielsweise nach einem Myokardinfarkt, folgt die Aktivierung des Sympathikus und der Plasmaspiegel von Noradrenalin steigt dauerhaft. Noradrenalin bindet an β -Rezeptoren, wodurch die Herzfrequenz und Schlagkraft zunehmen. Binnen Minuten passt sich die Signalkaskade an die dauerhafte Aktivierung der β -Rezeptoren an: das Herz reagiert primär schwächer auf Stimulation und β -Rezeptoren werden ins Innere der Zelle aufgenommen. Um diese Phänomene zu verstehen und zielgerichtete therapeutische Ansätze nachzuvollziehen ist eine genaue Kenntnis der Funktionsweise und Abläufe am β -Rezeptor erforderlich.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

β -Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese stellen mit über 1000 Vertretern die größte Familie aller Membranproteine dar und vermitteln die meisten zellulären Reaktionen auf Hormone und Neurotransmitter [Gether 2000, #44], [Kolakowski 1994, #45]. Alle GPCR besitzen einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus und bestehen aus sieben transmembranären α -Helices, die durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen alternierend miteinander verbunden sind. Diese sieben, für den Rezeptor charakteristischen α -Helices, bilden die Ligandenbindungstasche.

Die bedeutsamsten GPCR im Herzen sind β -Rezeptoren. Diese werden in β_1 -, β_2 - und β_3 -Subtypen unterteilt, wobei letzterer vor allem im Fettgewebe anzutreffen ist [Bönisch, Graefe et al. 2011, #46]. Im menschlichen Herz zeigt sich eine heterogene Verteilung der β_1 - und β_2 -Subtypen: 65/35 % in den Vorhöfen und 75/25 % in den Herzkammern [Brodde, Schuler et al. 1986, #47]. Sowohl die Aktivierung von β_1 - als auch β_2 -Rezeptoren führt zur Steigerung der Kontraktionskraft sowie der Schlagfrequenz des Herzens. Bei einem aktivierten GPCR werden dem G-Protein hochaffine aktivierende Aminosäuresequenzen der intrazellulären Schleifen präsentiert [Ghanouni, Gryczynski et al. 2001, #48].

1.3 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Proteinketten, die nach ihrem Molekulargewicht, in abnehmender Reihenfolge, in α -, β - und γ -Untereinheiten eingeteilt werden [Gilman 1987, #49], [Hoffman and Lefkowitz 1980, #50], [Ahlquist 1948, #51]. Die α -Untereinheit ist über einen Lipidanker in der Zellmembran verankert und verfügt über eine Bindungsstelle an welcher, je nach Aktivitätszustand, ein Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) gebunden ist. Die β - und γ -Untereinheiten sind ebenfalls über einen Lipidanker der γ -Untereinheit in der Zellmembran verankert. Bei einem nicht aktivierten Rezeptor bilden alle drei Untereinheiten einen Komplex, der allerdings nur dann stabil ist, wenn die α -Untereinheit GDP gebunden hat. Nach Aktivierung des GPCR bindet die α -Untereinheit an den GPCR und vollzieht ihrerseits eine Konformationsänderung, die zur Abspaltung von GDP führt. Die nun freie Bindungsstelle wird durch GTP belegt und stabilisiert die Konformation der α -Untereinheit. In dieser räumlichen Anordnung löst sich die α -Untereinheit sowohl vom GPCR als auch von der β/γ -Untereinheit. Beide Untereinheiten präsentieren in dieser Form Peptidschleifen, die mit dem Effektormolekül reagieren und dieses aktivieren können [Strader, Fong et al. 1994, #52]. Die α -Untereinheit verfügt über GTPase-Aktivität: das gebundene GTP wird langsam zu GDP und Phosphat hydrolysiert, wodurch die

α -Untereinheit in ihren inaktiven Zustand zurückfällt und wieder an die β/γ -Untereinheit bindet - der Komplex steht für eine erneute Aktivierung bereit [Cassel and Selinger 1978, #53], [Spiegel and Weinstein 2004, #54].

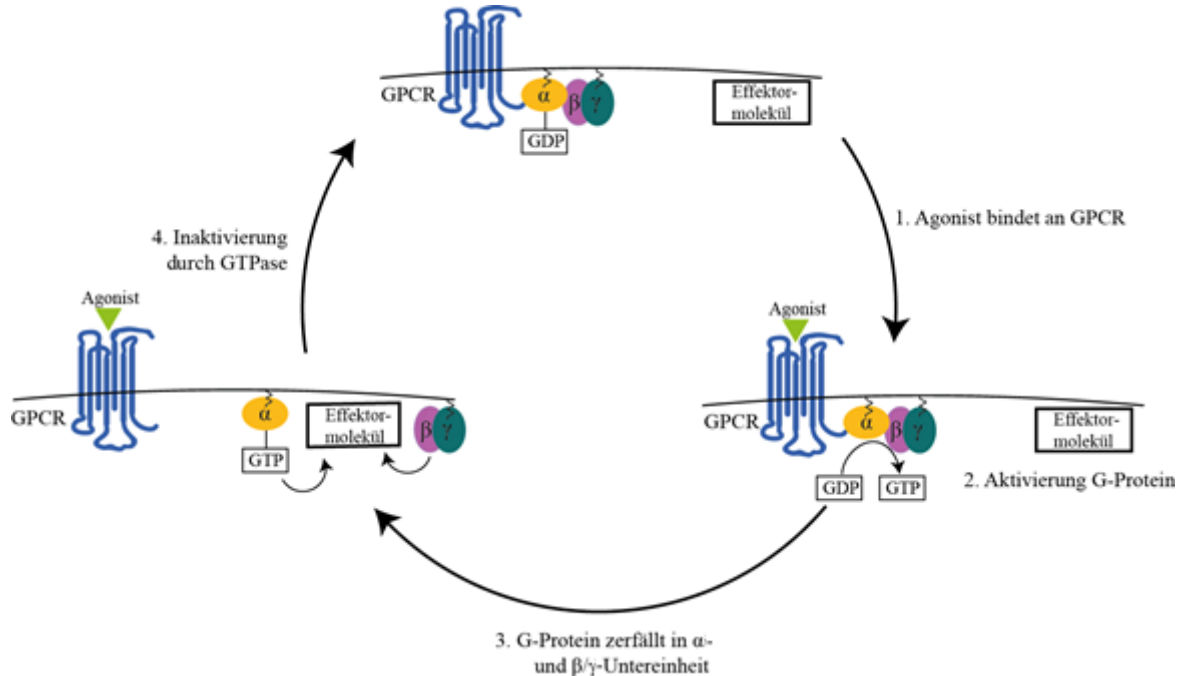


Abbildung 2: Schema der G-Protein vermittelten Signaltransduktion

(1) Der Botenstoff (Agonist) bindet an die extrazelluläre Bindungsstelle des G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) und bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. (2) Diese Konformationsänderung führt am heterotrimeren G-Protein zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP). (3) Das nun aktivierte G-Protein dissoziiert in seine GTP-bindende α -Untereinheit und den β/γ -Komplex, die jeweils unabhängig, verschiedene Effektorproteine aktivieren oder hemmen können. (4) Die α -Untereinheit besitzt intrinsische GTPase Aktivität: nach Hydrolyse von GTP zu GDP wird die α -Untereinheit inaktiviert und bildet mit der β/γ -Untereinheit erneut einen heterotrimeren Proteinkomplex.

1.4 Molekulare Mechanismen der Muskelkontraktion

Kardiomyozyten sind mechanisch miteinander verbunden und in der Lage sich aktiv zu verkürzen. Eine besondere Rolle spielen hierbei Myofilamente aus Aktin und das Motorprotein Myosin II. Auf molekularer Ebene findet bei einer Kontraktion ein zyklisch wiederholtes Anhaften und Ablösen zwischen Aktin und Myosin statt, wodurch die Filamente aneinander entlanggleiten. Die kleinste kontraktile Einheit eines Muskels, das Sarkomer, ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt [Adelstein and Eisenberg 1980, #55].

1.4.1 Effektormoleküle der heterotrimeren G-Proteine

Die Familie der GPCR vermittelt zahlreiche zelluläre Effekte, dennoch aktiviert jeder einzelne GPCR nur eine relativ kleine Anzahl an G-Proteinen. Die Kombinationen von α -, β - und γ -Untereinheiten bestimmen die Affinität des G-Proteins sowohl zum GPCR als auch zum Effektorprotein [Katada, Bokoch et al. 1984, #56], [Oldham and Hamm 2008, #57]. Heterotrimere G-Proteine werden anhand ihrer α -Untereinheit in 4 Hauptklassen eingeteilt: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 12}$ [Simon, Strathmann et al. 1991, #58].

β -adrenerge Rezeptoren (β -AR) koppeln an das Adenylatzyklase-stimulierende Protein. Abhängig vom Botenstoff, welcher an einen GPCR bindet, wird die Adenylatzyklase über ein stimulierendes G-Protein aktiviert oder ein inhibierendes G-Protein gehemmt (siehe Tabelle 1). Einige GPCRs sind in der Lage unterschiedliche G-Proteine zu aktivieren [Pedersen and Ross 1982, #59]. So spielt bei β -adrenergen Rezeptoren auch eine Kopplung an das Pertussistoxin-sensitive $G_{\alpha i}$ eine Rolle. Dazu zählt eine $G_{\alpha i}$ -Kopplung des β_2 -AR und eine damit verbundene Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) [Stephens, Smrcka et al. 1994, #60]. Experimentell wurde gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität der PKB einen antiapoptotischen Einfluss zeigt [Matsui and Rosenzweig 2005, #61].

Tabelle 1: G-Protein Familien und deren Effektorproteine

Subfamilie	aktivierende Liganden	Effektorprotein
G_s		
α_s	Adrenalin (β -adrenerge Rezeptoren), Glucagon, TSH, LH, FSH, ADH	Adenylatzyklase \uparrow
G_i		
$\alpha_i1, \alpha_i2, \alpha_i3$	Adrenalin (α_2 -adrenerge Rezeptoren)	α_i -Untereinheit: Adenylatzyklase \downarrow β/γ -Untereinheit: Phospholipase C β \uparrow – K $^+$ -Kanäle \uparrow – Ca $^{2+}$ -Kanäle \downarrow
G_q		
$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}-\alpha_{16}$	Adrenalin (α_1 -adrenerge Rezeptoren)	Phospholipase C β \uparrow , IP3 \uparrow , DAG \uparrow , Ca $^{2+}$ \uparrow
G_{12}		
α_{12}, α_{13}	5-HT2c, Bradykinin, α_1 -adrenerge Rezeptoren	Aktivierung von Austauschfaktoren für kleine G-Proteine der Ras-Familie

Einteilung der G-Proteine anhand ihrer Hauptklassen mit exemplarischen Vertretern. Tabelle modifiziert nach [Rainer Deutzmann 2012, #62]

1.4.1.1 Adenylatzyklen

Adenylatzyklen sind in der Plasmamembran lokalisiert und synthetisieren den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Alle Formen werden durch $G_{\alpha s}$ aktiviert. Die Proteinkinase A (PKA) ist ein Enzym aus der Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Sie besitzt in ihrer inaktiven Form jeweils zwei regulatorische und zwei katalytische Untereinheiten. Jede katalytische Untereinheit verfügt über jeweils zwei Bindungsstellen für cAMP. Bei Bindung von cAMP erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. Die PKA ist an zahlreichen Stoffwechselvorgängen beteiligt. Im folgenden Abschnitt werden die Auswirkungen der PKA auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten dargestellt.

Zu den Proteinen, welche durch die PKA phosphoryliert werden, zählen wesentliche Schlüsselproteine der Kontraktion. Am Herzen führt die Stimulation der PKA zur Phosphorylierung der L-Typ Calciumkanäle, englisch *L-type calcium channel (LTCC)*, wodurch der transmembranäre Calciumeinstrom erhöht wird. Der Calciumeinstrom löst durch Aktivierung des herzspezifischen Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) aus. Außerdem steigert die Phosphorylierung des RyR2 durch die PKA dessen Öffnungswahrscheinlichkeit: Phospholamban (PLN) inhibiert die sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA). PLN kann sowohl durch die cAMP-abhängige PKA als auch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMK II) phosphoryliert werden, wodurch sie ihren hemmenden Einfluss auf SERCA verliert [Karczewski, Kuschel et al. 1997, #63], [Polakova, Illaste et al. 2015, #64]. Weiterhin phosphoryliert die PKA kardiales Troponin I (TnI), wodurch dessen Calciumsensitivität abnimmt und eine schnellere Relaxation in der Diastole ermöglicht wird [Layland, Solaro et al. 2005, #65].

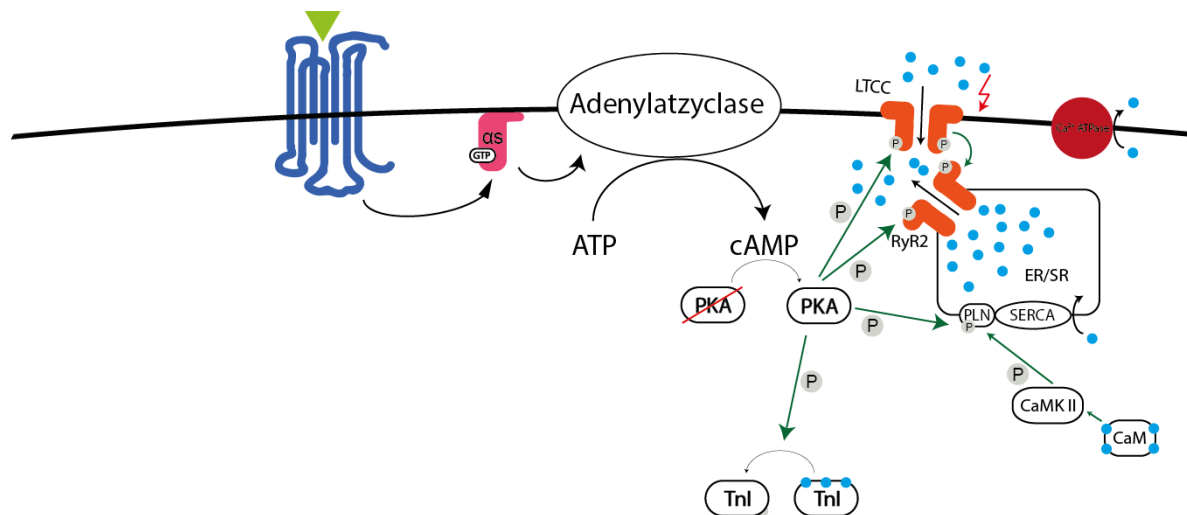


Abbildung 3: Einfluss der PKA auf Schlüsselproteine der kardialen Kontraktion

Wirkungen der cAMP-anhängigen Proteinkinase (PKA) auf die kardiale Kontraktion: Phospholamban (PLN) kann durch die PKA und die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMK II) phosphoryliert werden, wodurch es ihren hemmenden Einfluss auf die sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA) verliert. Der Calciumeinstrom (Ca^{2+} als blaue Punkte dargestellt) durch den L-Typ Calciumkanal (LTCC) kann durch PKA vermittelte Phosphorylierung des Kanals gesteigert werden. Weiterhin phosphoryliert die PKA kardiales Troponin I (TnI), wodurch dessen Calciumsensitivität abnimmt und eine schnellere Relaxation in der Diastole ermöglicht wird. Phosphoryliert die PKA RyR2, so wird dessen Aktivität gesteigert.

1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Eukaryotische Zellen regulieren Stärke und Dauer einer GPCR induzierten Signaltransduktion um sich an ändernde extrazelluläre Bedingungen anzupassen und eine Daueraktivierung zu vermeiden. Einen bedeutenden Desensibilisierungsmechanismus vermitteln G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und Arrestin: GRKs phosphorylieren Serin- und Threoninreste an der dritten intrazellulären Schleife und/oder am C-Terminus eines aktivierten GPCR, wodurch dieser eine hohe Affinität zu Arrestin entwickelt [Gurevich and Gurevich 2006, #66], [Huang and Tesmer 2011, #67]. Arrestin bindet an den GPCR und blockiert diesen für Interaktionen mit heterotrimeren G-Proteinen [Pitcher, Freedman et al. 1998, #68], [Lohse, Benovic et al. 1990, #69], [Daaka, Luttrell et al. 1998, #70], [Krupnick and Benovic 1998, #71], [Ferguson 2001, #72], [Goodman, Krupnick et al. 1996, #73], [Wilden, Wust et al. 1986, #74]. Neben der GRK-vermittelten homologen Desensibilisierung, die innerhalb weniger Sekunden eintritt, existiert die wesentlich langsamere heterologe Desensibilisierung durch von einem sekundären Botenstoff abhängige Proteinkinasen z.B. PKA oder PKC, die innerhalb von Minuten greift [Benovic, Pike et al. 1985, #75], [Roth, Campbell et al. 1991, #76]. In Folge einer GPCR-Aktivierung steigt die zytosolische Konzentration an sekundären Botenstoffen wodurch von sekundären Botenstoffen abhängige Proteinkinasen aktiviert

werden und in einem Rückkopplungsmechanismus GPCR phosphorylieren. Dabei werden auch nicht aktivierte Rezeptoren phosphoryliert [Thompson, Cole et al. 2008, #77], [Krasel, Bunemann et al. 2005, #78], [Gurevich, Dion et al. 1995, #79]. Nach Bindung an phosphorylierte GPCR initiiert Arrestin, nach Bindung an das Adapterprotein AP-2, eine Clathrin-vermittelte Endozytose [Yu, Lefkowitz et al. 1993, #80], [Moore, Milano et al. 2007, #81]. Der Rezeptor wird dann entweder dephosphoryliert und zur Membran zurücktransportiert oder in Lysosomen vollständig abgebaut [Hanyaloglu and von Zastrow 2008, #82].

1.5.1 Die Familien der GRK

In Säugetieren wurden bisher insgesamt sieben GRKs identifiziert, die sich aufgrund unterschiedlicher Rezeptoraffinitäten und Funktionen in drei Unterfamilien gliedern [Benovic, DeBlasi et al. 1989, #83],[Sibley, Strasser et al. 1986, #84].

Molekular unterscheiden sich die GRK Unterfamilien hauptsächlich durch verschiedene Aminosäuresequenzen im C-Terminus. Auch ist ihr Vorkommen stark gewebspezifisch: GRK1 und GRK7 sind Mitglieder der ersten Unterfamilie, sie werden nahezu ausschließlich in Stäbchen und Zapfen des Auges exprimiert. Sie verfügen über einen prenylierten C-Terminus, welcher sie in der Zellmembran verankert. GRK2 und GRK3 sind β -adrenerge Rezeptorkinasen und gehören der zweiten Unterfamilie an. Sie werden ubiquitär exprimiert und repräsentieren die im Herzen häufigste Isoform [Premont, Inglese et al. 1995, #85, Lymperopoulos, Rengo et al. 2012, #86]. Diese Kinasen verfügen über einen C-Terminus mit einer PH-Domäne (*Pleckstrin homology domain*), welche mit freien $\beta\gamma$ -Untereinheiten in der Membran interagiert und daher eine Translokation zytosolischer GRK2 und GRK3 zur Zellmembran fördert sobald ein heterotrimeres G-Protein an einem aktivierten GPCR in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziiert [Evron, Daigle et al. 2012, #87]. Die dritte Unterfamilie umfasst die im Hoden exprimierte GRK4 sowie die ubiquitär exprimierten GRK5 und GRK6.

GRK5 verfügt über keine PH-Domäne und vollzieht folglich keine Agonisten induzierte Membrantranslokation. GRK2 und GRK3 zeigen sich beim Einleiten einer Clathrin-vermittelten Endozytose effektiver als GRK5 und GRK6 [Ren, Reiter et al. 2005, #88].

1.5.2 Therapeutische Ansätze durch Hemmung der GRK2

Nach einem Herzinfarkt konnte in murinen Herzen ein deutlicher Anstieg der GRK2 Expression beobachtet werden [Wang, Gao et al. 2015, #89]. Auch im menschlichen Herzen

zeigt sich bei Herzinsuffizienz eine erhöhte GRK2 Expression [Ungerer, Parruti et al. 1994, #90].

Mehrere Untersuchungen legen einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Sensibilität von β -Rezeptoren und einer erhöhten Expression der GRK2 nahe: so zeigte eine an Rattenherzen durchgeführte Untersuchung, dass eine anhaltende myokardiale Ischämie mit einer erhöhten mRNA-Expression von GRK2 einhergeht und die Aktivität der dem β -Adrenorezeptor nachgeschalteten Adenylatcyclase vermindert [Ungerer, Kessebohm et al. 1996, #91].

GRK2 Knockout Mäuse zeigten bei erhöhter Nachlast signifikant weniger pathologische Umbauvorgänge am Herzen sowie eine uneingeschränkte Sensibilität der β -Adrenorezeptoren [Raake, Vinge et al. 2008, #92]. Diese Untersuchungen zeigen die Bedeutung von GRK2 bei Umbauvorgängen am Herzen nach einem Infarkt und untermauern Therapiestrategien, welche auf eine Hemmung der GRK2 abzielen.

Durch adenovirale Expression eines Peptides, des C-Terminus der GRK2 („ β ARKct“), konnten bei Mäusen bereits vielversprechende Resultate erzielt werden [Dorn 2009, #93], [Rockman, Chien et al. 1998, #94]. GRK2 zeichnet sich neben einer erhöhten Expression im Herzen durch eine Bindungsstelle für die $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aus. Das Peptid „ β ARKct“ konkurriert mit GRK2 um $\beta\gamma$ -Untereinheiten und reduziert die Translokation von GRK2 zur Zellmembran, wodurch eine GRK2-vermittelte Desensibilisierung β -adrenerger GPCR gestört werden konnte. Durch Expression des Peptides „ β ARKct“ konnte die Kontraktilität von Kardiomyozyten sowohl bei genetisch bedingten als auch erworbenen Kardiomyopathien gesteigert werden [Rockman, Chien et al. 1998, #94], [Harding, Jones et al. 2001, #95], [Freeman, Lerman et al. 2001, #96], [Williams, Hata et al. 2004, #97].

Ein weiterer GRK2 Inhibitor wurde 2012 durch Thal *et al.* beschrieben. Paroxetin ist ein Vertreter der selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmer (SSRI) und zeigt eine hohe Affinität und Spezifität zu GRK2. Durch Paroxetin konnte an isolierten Kardiomyozyten bei Stimulation mit Isoproterenol eine gesteigerte Inotropie beobachtet werden [Thal, Homan et al. 2012, #98].

1.6 Das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP)

Kardiomyozyten verfügen über einen endogenen Inhibitor von GRK2: das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP). RKIP wird durch das Gen PEBP1 kodiert und gehört zur Familie der Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteine und findet sich in einer Vielzahl von Organismen. So wurde RKIP erstmals im Rinderhirn isoliert und später in anderen Säugetieren, u.a. Menschen und Ratten, nachgewiesen [Bernier and Jolles 1984, #99], [Seddiqi, Bollengier et al. 1994, #100]. Alle etwa 400 Mitglieder der PEBP Familie verfügen über eine Bindungstasche für Phosphatidylethanolamin und andere Lipide, bisher konnte jedoch kein physiologischer Ligand für PEBP1 identifiziert werden [Skinner and Rosner 2014, #101]. RKIP ist ein lösliches Protein, besteht aus 187 Aminosäuren und verfügt in Säugetieren über ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa. Die dreidimensionale Struktur wurde durch Röntgenkristallographie ermittelt und zeigt ein zentrales β -Faltblatt mit fünf antiparallelen Strängen, welches von α -Helices und einem kleineren β -Faltblatt umgeben ist [Banfield, Barker et al. 1998, #102]. Im Laufe der Zeit wurden mehrere Kinasen identifiziert, die an RKIP binden und deren Aktivität durch diese Verbindung beeinflussen können. Dadurch rückte die physiologische Funktion von RKIP als Kinaseregulator in den Vordergrund. Der Fähigkeit Phosphatidylethanolamin zu binden konnte bis heute keine physiologische Funktion beigemessen werden [Skinner and Rosner 2014, #101]. Die Bezeichnung RKIP geht auf die Beobachtung von Yeung et al. zurück, die eine Raf1-inhibierende Eigenschaft von RKIP beschrieben [Yeung, Seitz et al. 1999, #103]. Über eine inhibierende Wirkung auf Raf1 nimmt RKIP wesentlichen Einfluss auf die Raf/MEK/ERK Signalkaskade und übt damit einen zentralen Einfluss auf Differenzierung, Zellwachstum, Proliferation, Migration und Apoptose aus [Zeng, Imamoto et al. 2008, #104], [Yeung, Rose et al. 2001, #105]. Eine Phosphorylierung von RKIP durch die Proteinkinase C an S153 induziert eine Interaktion von RKIP mit GRK2 [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106]. Die beschriebene Phosphorylierung stellt eine Art molekularen Schalter dar: nach erfolgter Phosphorylierung an S153 bildet RKIP ein Dimer [Deiss, Kisker et al. 2012, #107]. Die Dimerisierung beendet die Interaktion von RKIP mit Raf1 und ermöglicht eine Interaktion von dimerisiertem RKIP mit GRK2. RKIP bindet an den N-Terminus von GRK2 [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106], welcher an der Interaktion mit aktivierten GPCR beteiligt ist [Huang and Tesmer 2011, #67].

Die PKC zählt zu den Serin/Threonin-Kinasen und reguliert eine Vielzahl zellulärer Abläufe, darunter Zellproliferation, Apoptose, gesteigerte Transkription und Translation von Genen, die Regulierung von Kanälen und Rezeptoren und vieles mehr [Mochly-Rosen, Das et al.

2012, #108]. Die PKC wird durch eine Vielzahl von Hormonen (beispielsweise Adrenalin und Angiotensin), Wachstumsfaktoren (beispielsweise dem *Epidermal Growth Factor (EGF)* oder Insulin) und Neurotransmittern (beispielsweise Dopamin und Endorphin) aktiviert.

Eine veränderte RKIP Expression kann weitreichende physiologische Folgen nach sich ziehen. So wurde unter anderem eine verminderte RKIP Expression bei Alzheimer-Patienten beobachtet [Okita, Matsukawa et al. 2009, #109]. Bei erhöhter RKIP Expression konnte eine geringere Metastasierungsrate von Adenokarzinomen der Brust beobachtet werden [Dangi-Garimella, Yun et al. 2009, #110]. Zudem geht eine erhöhte RKIP-Expression mit einer erhöhten kardialen Kontraktilität bei gesteigerter Calciumfreisetzung in Kardiomyozyten sowie einer beschleunigten Calciumwiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum einher [Schmid, Neef et al. 2015, #111]. Bei Asthma konnte durch eine kompetitive Hemmung von RKIP eine gesteigerte Expression der Epitheliale 15-lipoxygenase 1 beobachtet werden [Zhao, O'Donnell et al. 2011, #112].

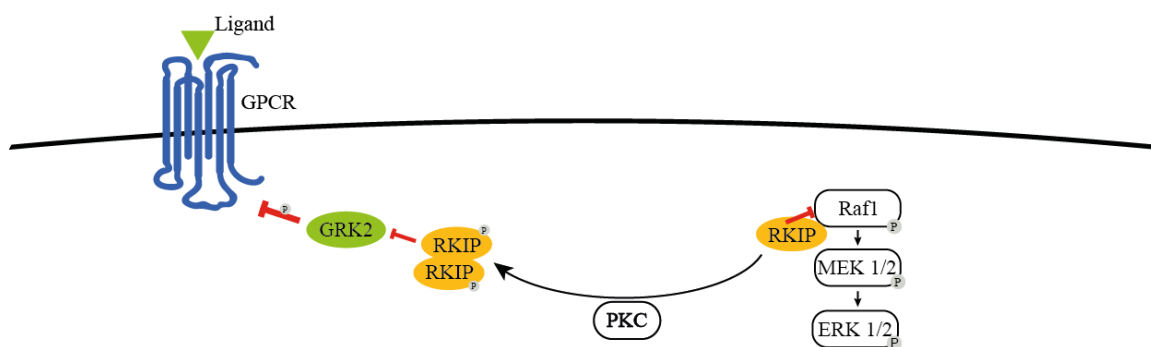


Abbildung 4: RKIP hemmt Raf1 oder GRK2 abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus.

Unter basalen Bedingungen inhibiert das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Raf1 und damit die Aktivierung der Raf1/MEK/ERK-Kaskade. Nachdem RKIP durch Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert wurde dissoziieren RKIP und Raf1. RKIP inhibiert nun GRK2 und hemmt dadurch die Desensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

1.7 Raf-MEK-ERK Kaskade

Zu Beginn der 90er Jahre konnte durch biochemische und genetische Analysen die Raf/MEK/ERK Kaskade als erster kompletter Signalweg von der Zellmembran zum Zellkern aufgeklärt werden. Extrazelluläre Stimuli wie Peptidliganden und Wachstumsfaktoren aktivieren diesen Signalweg, über den die Genexpression im Zellkern reguliert und elementare zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Überleben, Zellteilung und Zelltod gesteuert werden [Antico Arciuch, Alippe et al. 2009, #113], [Kolch 2000, #114], [Kolch 2005, #115]. Extrazelluläre Stimuli aktivieren über verschiedene Rezeptoren an der

Zelloberfläche die GTPase Ras, welche ihrerseits eine Kaskade aus drei Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinase*, MAP-Kinase-Kaskade) aktiviert. Die Signaltransduktion zeichnet sich durch sequenzielle Phosphorylierung und damit Aktivierung der hintereinandergeschalteten Serin-/Threonin-Kinasen aus. Nach Aktivierung von Ras rekrutiert dieses die MAP3 Kinase Raf an die Membran und aktiviert Raf. In der nun in Gang gesetzten Kaskade aktiviert Raf die MAP2 Kinasen MEK1/2 durch Phosphorylierung, welche wiederum die nachgeschalteten MAP Kinasen ERK1/2 phosphoryliert und damit aktiviert. ERK1/2 phosphorylieren Zielproteine im Zellkern, im Zytosol und an der Membran [Antico Arciuch, Alippe et al. 2009, #113], [Van Aelst, Barr et al. 1993, #116]. Ras gehört zur Familie der monomeren G-Proteine. Analog zur α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine sind mit GTP beladene monomere G-Proteine aktiv und können in dieser Konfiguration Zielproteine aktivieren; mit GDP beladene G-Proteine sind inaktiv. Der Austausch von GDP gegen GTP erfolgt durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*Guanine Nucleotide Exchange Factor* (*GEF*)). Bei heterotrimeren G-Proteinen wirkt der Rezeptor als *GEF*, bei Ras übernimmt der Nukleotid Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS) den Austausch von GDP gegen GTP. Unstimuliert liegt SOS im Komplex mit dem Adapterprotein *growth factor receptor bound protein 2* (GRB2), einem SH2-Domänen-Protein, im Zytosol vor. Die Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase bewirkt eine Rekrutierung von GRB2 und SOS zur Zellmembran, wo SOS mit dem, über einen Lipidanker in der Zellmembran verankerten Ras interagieren kann. Nach Austausch von GDP gegen GTP kann Ras die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren [Margolis and Skolnik 1994, #117]. Neben der beschriebenen Signalkaskade konnten Kolch *et al.* einen phosphorylierungsunabhängigen hemmenden Einfluss von Raf auf pro-apoptotische zelluläre Signalwege zeigen [Kolch 2005, #115].

Mitglieder der Ras Familie zählen zur Familie der Protoonkoge und zeigen in 20 % aller humanen Tumore onkogene Mutationen [Montagut and Settleman 2009, #118], [Maurer, Tarkowski et al. 2011, #119]. Raf- und MEK Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien getestet. Ein zelleigener Inhibitor der Raf/MEK/ERK-Kaskade ist wie in Kapitel 1.6 erläutert RKIP.

Die ergotrope Wirkung bei Aktivierung des sympathischen Nervensystems wird am Herzen durch Aktivierung der β -AR vermittelt. Hier spielen die Liganden Noradrenalin als Neurotransmitter und Adrenalin als Hormon eine bedeutende Rolle. Eine Aktivierung der β -AR Rezeptoren setzt eine Signalkaskade in Gang, die unter anderem die Ausschüttung von

Calcium in Kardiomyozyten auslöst und damit die Kontraktion einleitet. Die Abläufe und Mechanismen der kardialen Kontraktion werden in den folgenden Kapiteln beleuchtet.

1.8 Kontraktion von Kardiomyozyten

Die Herzfähigkeit wird unter anderem durch Inotropie, Chronotropie und Lusitropie beschrieben. Mechanische Herzaktionen ermöglichen die Pumpleistung des Herzens wodurch ein Organismus mit Sauerstoff versorgt werden kann. Im Folgenden wird die Arbeitsweise und Regulation der Herzmuskulatur näher betrachtet. Unter elektromechanischer Kopplung versteht man, dass ein elektrischer Reiz, das Aktionspotential, eine mechanische Antwort, die Kontraktion, auslöst [Niggli and Lipp 1995, #120].

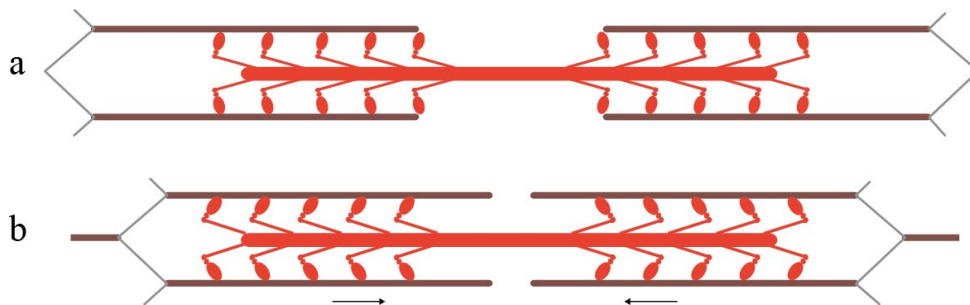


Abbildung 5: Ruhe- und Kontraktionszustand

Aufbau eines Sarkomers: Aktinfilamente (braun), Myosinfilamente (rot) a) im Ruhezustand, b) Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten zueinander. Die Bewegungsrichtung der Aktinfilamente wird anhand der Pfeile dargestellt. Modifiziert nach [Lüllmann-Rauch 2009, #121]

Aktinfilamente bestehen aus zwei helikal miteinander verwundenen Aktineinzelfäden, die ihrerseits lineare Proteinpolymere des kugelförmigen Proteins Aktin darstellen [Sellers and Adelstein 1987, #122]. Ebenfalls Bestandteil der Aktinfilamente ist das Regulatorprotein Troponin: nach sieben Aktinmolekülen folgen drei Troponinpeptide, die zusammen mit Tropomyosin die Muskelkontraktion regulieren.

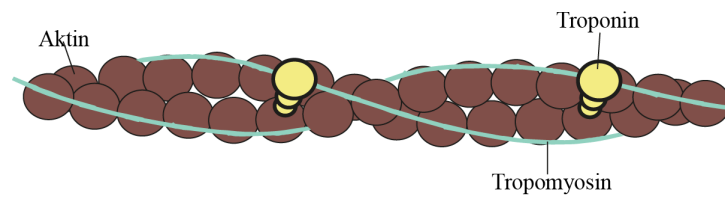


Abbildung 6: Schematischer Aufbau Aktinfilament

Aktinfilamente (braun) mit Tropomyosin (grün) und dem Regulatorprotein Troponin (gelb)

Bei zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $< 10^{-7}$ mol/l verhindert Tropomyosin eine Verbindung zwischen Myosinköpfchen und Aktinfilament im relaxierten Muskel. In Folge einer elektrischen Erregung der Muskelzelle steigt die zytosolische Ca^{2+} Konzentration und Ca^{2+} bindet an Troponin. Durch eine Konformationsänderung werden die Tropomyosinfäden stärker in die Furche der Aktin-Helix gezogen, wodurch Bindungsstellen zwischen Aktin und Myosin freigegeben werden [Herzberg and James 1985, #123], [Adelstein and Eisenberg 1980, #55].

1.8.1 Der Querbrückenzyklus

Das Myosinköpfchen besitzt ATPase-Aktivität und nutzt die aus der Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnene Energie um sich aufzurichten. Im 90° Winkel kann es sich an eine nun zugängliche Bindungsstelle des Aktinfilamentes anlagern und es kommt zur Querbrückenbildung. Anschließend neigt sich das Myosinköpfchen um 45° und zieht das Aktinfilament in Richtung Sarkomermitte. Durch die Lageänderung des Myosinköpfchens ändert sich dessen Konformation, wodurch ein neues ATP-Molekül gebunden werden kann. Bei erneuter Bindung von ATP löst sich die kurzzeitige chemische Bindung zum Aktinfilament und der Querbrückenzyklus kann erneut beginnen. Die Kontraktion wird beendet, wenn der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel unter 10^{-7} mol/l fällt [Schmidt, Lang et al. 2010, #124].

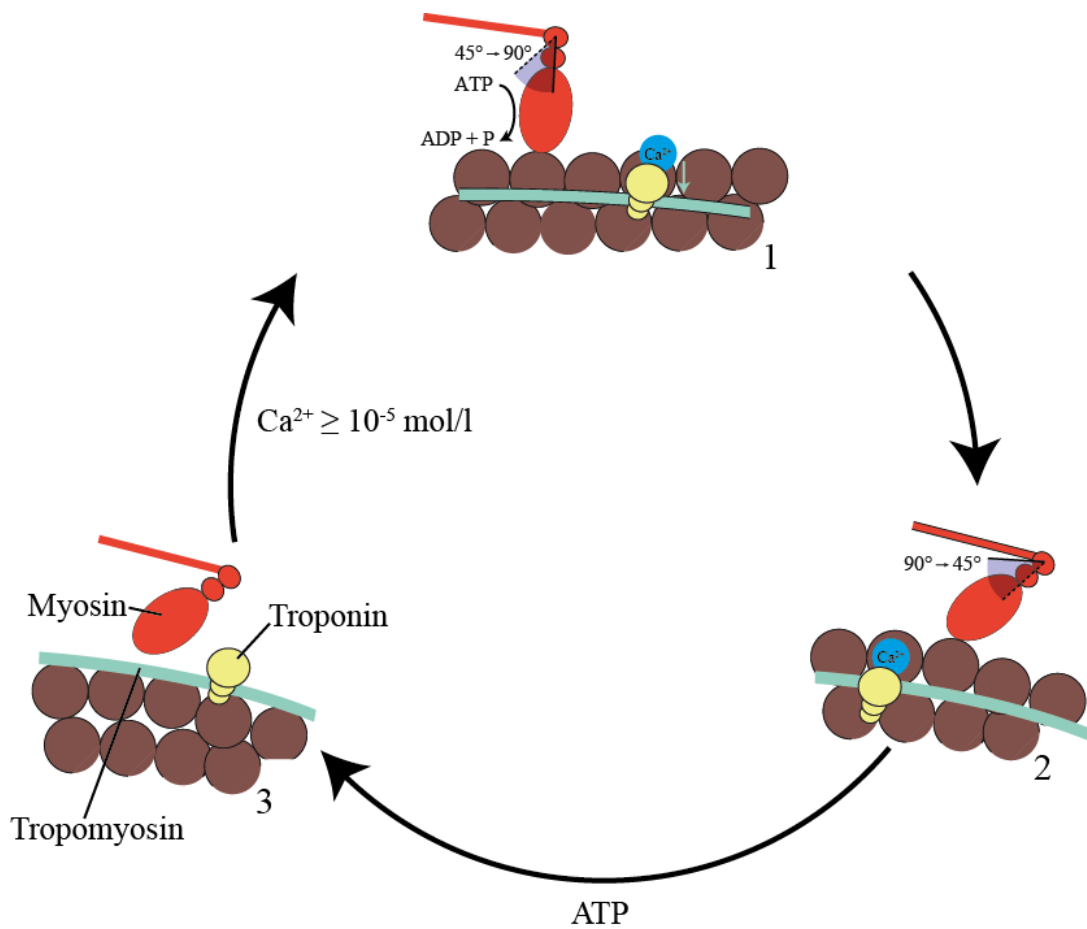


Abbildung 7: Querbrückenzyklus

1) Durch Spaltung von ATP richtet sich das Myosinköpfchen auf. Freies intrazelluläres Calcium bindet an Troponin, wodurch die Bindungsstellen des Aktinfilamentes dem Myosinköpfchen zugänglich gemacht werden. 2) Das Myosinköpfchen geht mit dem Aktinfilament eine chemische Bindung ein und neigt sich um 45° , wodurch das Aktinfilament zur Sarkomermitte gezogen wird. Durch die Konformationsänderung kann erneut ATP binden und sich das Myosinköpfchen vom Aktinfilament lösen. 3) Bei ausreichender intrazellulärer Ca^{2+} Konzentration kann der Zyklus erneut beginnen, ansonsten verharrt das System in Ruhestellung.

Extrazellulär liegt die Ca^{2+} -Konzentration bei 10^{-3} mol/l bis 20^{-30} mol/l. Intrazellulär beträgt die Ca^{2+} -Konzentration bei einem Kardiomyozyten in Ruhestellung 10^{-70} mol/l und kann bei Kontraktion auf 10^{-50} mol/l ansteigen [Carafoli 1985, #125]. Die Oberfläche eines Kardiomyozyten ist durch Einfaltungen, den sogenannten transversalen T-Tubuli, stark vergrößert, die tief in den Myozyten hineinragen. In der Zellmembran sind Transportsysteme in Form von Pumpen und Kanälen integriert, die den Calciumhaushalt regulieren. Der Calcium-Einstrom in die Zelle erfolgt über spannungsabhängige Calcium-Kanäle oder den Natrium/Calcium-Austauscher (englisch *Na⁺/Ca²⁺ exchanger* (NCX)) [Janczewski and Lakatta 1993, #126]. Zu Beginn jedes Herzschlages erhöht sich die intrazelluläre Calciumkonzentration um das Zehnfache. Dabei wird Calcium hauptsächlich aus dem SR über den RyR2 in das Zytosol abgegeben. Anschließend pumpt die SERCA2a Calcium in das SR, wodurch die zytosolische Calciumkonzentration absinkt und die Kardiomyozyten relaxieren.

Transmembranärer Calciumeinstrom in den Kardiomyozyten

Während eines Aktionspotentials wird der Calciumeinstrom in den Kardiomyozyten vorwiegend durch Calciumkanäle bestimmt. Neben dem L-Typ Calciumkanal, welcher den Calciumeinstrom maßgeblich beeinflusst, sind auch Calciumkanäle vom T-Typ bekannt, die ebenfalls zum Calciumeinstrom in einen Kardiomyozyten beitragen. Der L-Typ Calciumkanal gilt als der klassische Calciumkanal am Herzen, wodurch er im Fokus zahlreicher Untersuchungen stand [Campbell, Giles et al. 1988, #127]. Der Calciumeinstrom durch den L-Typ Calciumkanal kann durch β -adrenerge Stimulation und anschließende Phosphorylierung des Kanals gesteigert werden [Hess 1988, #128]. Der im Sarkolemm befindliche NCX transportiert während der Diastole Calcium im Austausch gegen drei Natrium aus der Zelle hinaus. Treibende Kraft ist hierbei der Natrium-Gradient über die Membran. Dieser wird über die Natrium/Kalium-ATPase aufrecht erhalten. Üblicherweise wird durch den NCX Calcium von intra- nach extrazellulär befördert. Bei einem starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kann sich die Transportrichtung des NCX auch ändern, er befindet sich dann im „*reversed mode*“ und kann Calcium-Ionen in die Zelle transportieren [Goldhaber and Philipson 2013, #129]. Die Calcium-ATPase transportiert Calcium unter ATP-Verbrauch aus der Zelle. Aufgrund ihrer langsamen Kinetik ist sie für die langfristige Calciumkonzentration, weniger aber für den Calciumtransport innerhalb eines Kontraktionszyklus, von Bedeutung [Caroni and Carafoli 1980, #130].

Intrazelluläre Calciumregulation

Das SR ist ein spezialisiertes endoplasmatisches Retikulum von Muskelzellen. Es besteht aus longitudinalen L-Tubuli und terminalen Zisternen, die mit den T-Tubuli des Sarkolemm in Verbindung stehen. Das SR ist ein intrazellulärer Calciumspeicher; seine Funktion besteht in Speicherung und Freisetzung von Calcium. Als weitere zelluläre Calciumspeicher werden Mitochondrien und der Zellkern in Betracht gezogen [George J Siegel 1999, #131]. In der Membran des SR befinden sich mindestens zwei für den Calciumhaushalt wichtige Proteine: die SERCA sowie Ryanodinrezeptoren. Die SERCA ist im Herzen durch ihre Isoform SERCA-2 vertreten. Sie befindet sich hauptsächlich in den L-Tubuli des SR und transportiert durch Spaltung eines ATP-Moleküls zwei Calcium-Ionen in das SR. Die SERCA ist hauptverantwortlich für den Abtransport intrazellulären Calciums in den Calciumspeicher während der Diastole [Schatzmann 1989, #132]. Hauptregulator für die Calcium-Aufnahme in das SR ist das Protein PLN. PLN inhibiert die SERCA abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus. PLN kann durch die cAMP-abhängige PKA und die CaMKII phosphoryliert werden. Dadurch dissoziiert PLN von SERCA und übt keinen inhibitorischen Effekt aus [Karczewski, Kuschel et al. 1997, #63]. Ryanodin-Rezeptoren sind Kanäle, durch welche Calcium während der Systole aus dem SR freigesetzt werden kann. Sie sind hauptsächlich an den terminalen Zisternen des SR lokalisiert [Inui, Saito et al. 1987, #133]. Bereits submikromolare Konzentrationen an Calcium oder Koffein wirken aktivierend auf den Ryanodinrezeptor [Kim, Sreter et al. 1984, #134].

Calciumzyklus eines Kardiomyozyten

Die elektromechanische Kopplung im Herzen wird durch eine Calcium-induzierte Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum realisiert [Fabiato 1983, #135]. Die Oberfläche eines Kardiomyozyten ist durch Einfaltungen, sogenannten transversalen T-Tubuli, stark vergrößert und steht in enger räumlicher Beziehung zu den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch die sarkoplasmatischen Calciumkanäle in unmittelbarer Nähe der Ryanodinrezeptoren liegen. Bei einem Aktionspotential öffnen sich die spannungsabhängigen Calciumkanäle im Sarkolemm – es strömt Calcium ins Zellinnere. In geringem Umfang können auch NCX hierzu beitragen [Barry and Bridge 1993, #136], [McDonald 1982, #137]. Durch diesen Calciumeinstrom werden die Ryanodinrezeptoren aktiviert, welche große Mengen Calcium aus dem SR ins Zytosol entlassen [Fabiato 1983, #135]. Das freigesetzte Calcium bindet an Troponin und ermöglicht die Kontraktion in der Systole. Gleichzeitig inhibiert ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel sarkoplasmatische

Calciumkanäle und sorgt durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus für eine Beendigung des Signals [Bassani, Yuan et al. 1995, #138].

In der Diastole kommt es durch einen Abfall des intrazellulären Calciumspiegels zur Beendigung der Kontraktion. Zytoplasmatisches Calcium wird hauptsächlich über die SERCA ins SR transportiert, der NCX und die sarkolemmale Calcium-ATPase transportieren Calcium in den Extrazellulärraum [Bers and Bridge 1989, #139], [Janczewski and Lakatta 1993, #126].

1.9 Ziel dieser Arbeit

Abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus reguliert RKIP als Kinaseinhibitor verschiedene Signalwege. In unphosphoryliertem Zustand ist RKIP ein Raf-Inhibitor und nimmt durch Hemmung der Raf/MEK/ERK Kaskade Einfluss auf Zellproliferation und –überleben.

Es wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung von RKIP an S153 zu einer Hemmung der GRK2 führt und so einer Desensibilisierung von β -adrenergen Rezeptoren entgegenwirkt sowie zu einer Kontraktionssteigerung des Herzens führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei mögliche weitere Phosphorylierungsstellen von RKIP an S51 bzw. S52 untersucht. Erforscht wurde, ob eine an Aminosäureposition 51 oder 52 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutante in Kardiomyozyten ebenfalls ein verändertes Kontraktionsverhalten zeigt. Dieser Arbeitshypothese liegt der Gedanke zugrunde, dass eine Phosphorylierung an der Aminosäureposition 51 oder 52 die Phosphorylierung an Position S153 allosterisch beeinflussen kann und somit die positiv inotrope Wirkung einer RKIP-Überexpression herabsetzt oder steigert.

Dazu wurden experimentelle Modelle etabliert, um die Kontraktion neonataler Rattenkardiomyozyten quantitativ anhand von Spontankontraktionen als auch qualitativ anhand des *Calcium cyclings* darzustellen. Anschließend wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit wildtypischem RKIP oder phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutanten transduziert und in ihrem Kontraktionsverhalten vergleichend analysiert. Für die Phosphorylierung von S51 und S52 postuliert eine Kooperationspartnerin einen PKA-vermittelten "Feedback"-Mechanismus. Um zu überprüfen ob die PKA RKIP an S51 bzw. S52 tatsächlich phosphoryliert wird, wurden an NRCM Kontraktionsmessungen durchgeführt.

Da auch eine Phosphorylierung an S51 oder S52 ohne Einfluss auf die Kontraktilität möglich erscheint wurde in einem *in vitro* Kinase Assay eine mögliche Phosphorylierung durch die PKA oder PKC mit radioaktivem [γ -³²P]-ATP durchgeführt. Untersuchungsgegenstand war es herauszufinden, ob PKA und/oder PKC RKIP im diskutierten Phosphorylierungsmotiv phosphorylieren. Als Substrate wurden Wildtyp RKIP sowie eine, an der bekannten Phosphorylierungsstelle S153 phosphorylierungsdefiziente, RKIP Mutante eingesetzt.

2 Material

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen AppliChem (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Kits oder methodenspezifische Chemikalien werden bei ihrer Verwendung im folgenden Kapitel genannt. Als Lösungsmittel diente, sofern nicht anders angegeben, mehrfach destilliertes Wasser.

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Amicon® Ultra Zentrifugeneinheiten	Millipore
Chromatographiepapier	Hartenstein
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	GE Healthcare/Hartenstein
Entwicklungslösungen für Autoradiographiefilme	Sigma-Aldrich
Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose	Quiagen
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare
Chromatographiesäulen	Biorad
Röntgenfilm	Fujifilm
Zellkulturschalen	Nunc

2.2 Kits

Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Proteinbestimmung von Lysaten	BCA Protein Assay Kit®	Pierce
Detektion von Westernblots	ECL Plus Detection Reagents®	GE Healthcare
Expressionsvektor	pcDNA™3	Invitrogen™

2.3 Geräte

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
β-Szintillationszähler LB 122	Berthold
Axiovert 135	ZEISS
PMI Personal Molecular Imager	Bio-Rad
Sreen Eraser – K	Bio-Rad
Imaging Screen K	Bio-Rad
Infrarotlampe 150W	Philips
AE31	Motic
Hyperswitch	IonOptix
Set zur Kontraktilitätsmessung	IonOptix
Minipuls 2	Gilson
LE-70 Ultrazentrifuge	BECKMAN

Rotanta 96R
SPECTRAmax Plus 384
Ultra-turrax

Hettich
Molecular Devices
IKA Labortechnik

2.4 Substanzen

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem
5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU)	Sigma
Acrylamid 30%	Roth
Agar	Applichem
Agarose	Applichem
Albumin (Fraktion V)	Applichem
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Applichem
Bromophenolblau	Applichem
CaCl ₂	Applichem
Deoxyribonuclease (DNase)	Sigma
Dextrose (± D-Glucose)	Applichem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Fura 2	Invitrogen
Glycerol	Applichem
Glycin	Applichem
H ₂ O ₂ (30% v/v)	Applichem
Isoproterenol	Sigma
Kanamycin	Applichem
KCl	Applichem
Luminol	Alexis
Methanol	Sigma
MgCl ₂	Applichem
<i>Minimum essential medium</i> (MEM)	Sigma
NaCl	Applichem
NaOH	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
NP40	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH
PeqGOLD Protein-Marker III	Peqlab
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech GmbH
Polylysin	Sigma
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris	Applichem

Triton X-100
Trockenmilchpulver
Trypanblau 0.4 % (m/v)
Tween 20
Vitamin B12

Sigma
Applichem
Sigma
Sigma
Sigma

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Zellen, die aus einem Gewebe isoliert und in einem Nährmedium außerhalb des Organismus kultiviert werden, bezeichnet man als Primärzellen. Sie spiegeln als Zellkultur das Verhalten ihres Ursprungsgewebes besser wider als Zellen, die immortalisiert wurden [Kaur and Dufour 2012, #140].

3.1.1 Präparation und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Die neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) wurden aus 1-2 Tage alten Sprague Dawley Ratten (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) gewonnen. Die Präparation und das Aussäen der Zellen wurde von Nadine Yurdagül-Hemmrich durchgeführt. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Herzen in eisgekühlten, sterilen CBFHH Puffer überführt, dem Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) beigesetzt wurde. Unter einer Sterilbank wurden die Herzkammern von den Vorhöfen isoliert, zunächst mit einer feinen Schere mechanisch zerkleinert und anschließend in 15 ml DNase-haltiger Trypsinlösung in einem Becherglas unter ständigem Umrühren enzymatisch verdaut. Durch die zugesetzte DNase wurde ein Verklumpen der Einzelzellen durch die während des Verdaus freigesetzte DNA minimiert [Steinberg 1963, #141]. Alle 10 Minuten wurde der zellhaltige Überstand abgenommen und in *Fetal Calf Serum* (FCS) überführt um den enzymatischen Verdau zu stoppen, wobei der erste Verdau (Vorverdau) verworfen wurde um Zelltrümmer und tote Zellen, die bei der mechanischen Zerkleinerung angefallen waren, auszusortieren.

CBFHH-Puffer (Calcium and Bicarbonate-free

Hanks with HEPES)

NaCl	136,90 mM
KCl	5,36 mM
MgSO ₄ x(H ₂ O) ₇	0,81 mM
Dextrose	5,55 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄ x(H ₂ O) ₇	0,34 mM
HEPES	20,00 mM
pH	7,4

Trypsinlösung

Trypsin	1,36 mg/ml
DNase Lösung	0,8 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
CBFHH	0,34 mM

DNase Lösung

DNase	2 mg/ml
NaCl	0,15 M

Nach Abschluss des enzymatischen Verdaus wurden die gesammelten, sich in Suspension befindlichen, Kardiomyozyten für 10 Minuten zentrifugiert (700 x g, Raumtemperatur) und die Zellpellets in *Minimum essential medium* (MEM), versetzt mit 5 % (v/v) FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und L-Glutamin (2 mM), resuspendiert. Mit einem Zellsieb (40 µm) wurden verbliebene, unverdaute Gewebsreste abfiltriert. Die Separation der einzelnen Zelltypen wurde mittels *Preplating* realisiert. Dabei wurde die Zellsuspension auf unbeschichteten Zellkulturschalen eine Stunde lang bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert. (Analog zum Vorgehen bei [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106]).

MEM

MEM	10,5 g
NaHCO ₂	4,2 mM
pH	7,3
Vitamin B12	0,1 % (v/v)

Da Kardiomyozyten gegenüber den übrigen Zellen eine lange Anheftungszeit besitzen, verbleiben erstere im Überstand, während sich Nichtkardiomyozyten (kardiale Fibroblasten, glatte Muskelzellen sowie Endothelzellen) sich auf dem Schalenboden absetzen [Chlopikova, Psotova et al. 2001, #142].

Der Überstand, welcher die präparierten neonatalen Kardiomyozyten enthielt, wurde abgenommen, eine Probe 1:1 mit einer 4 %igen (m/v) Trypanblau-Lösung versetzt und die

Zellzahl mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Durch Trypanblau werden avitale Zellen angefärbt, wodurch vitale Zellen ermittelt werden können [Tennant 1964, #143].

3.1.2 Deckgläser

Für eine spätere Calciumtransientenmessung wurden 8 Deckgläser (25 x 25 mm), Dicke 1 (CORNING) jeweils mit einem Fettstift (ImmEdge™ PEN - Vector Laboratories) rechteckig umrandet und in einer Zellkulturschale (5 cm Durchmesser) platziert. Beide wurden anschließend unter einer Sterilbank über 20 Minuten mittels UV Licht desinfiziert.

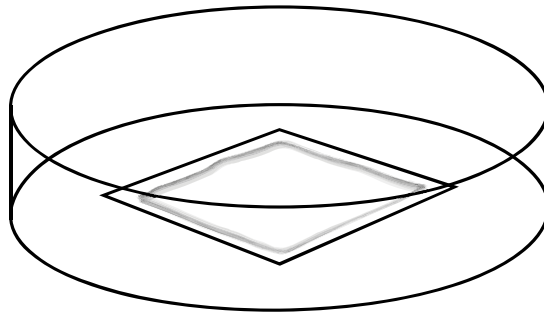


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Anschließend wurde auf dem Deckglas mittig ca. 50 μ l Polylysin appliziert. Bei Polylysin handelt es sich um ein positiv geladenes Polymer, welches durch elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Ionen der Zellmembran die Anheftung von Zellen an mit Polylysin beschichteten Oberflächen begünstigt [Mazia, Schatten et al. 1975, #144]. Nach 20 Minuten wurde das Polylysin abgenommen und durch DBPS Puffer ersetzt. Anschließend erfolgte das Aussäen der Zellen durch Nadine Yurdagül-Hemrich (160 000 Zellen pro Deckglas in 200 μ l MEM Medium (5 % FCS)). Nach 6 Stunden konnte von einer Anheftung der NRCM am Deckglas ausgegangen werden und die Zellkulturschale wurde vorsichtig mit 5 ml MEM Medium (5 % (v/v) FCS) aufgefüllt.

3.1.3 12-Näpfchen Platte

Für die spätere Herstellung von Proteinlysaten aus NRCM wurden 12 Näpfchen Platten, wie beschrieben, mit Polylysin behandelt und 500 000 NRCM/Näpfchen durch Nadine Yurdagül-Hemrich in 5% FCS MEM ausgesät.

3.1.4 96-Näpfchen Platte

Die 96-Näpfchen Platte wurde gemäß Abbildung 9 mit Polylysin behandelt, welches nach 20 Minuten mit DBPS Puffer substituiert wurde. Die umliegenden Näpfchen wurden mit Wasser befüllt, rechts und links wurde jeweils ein Temperaturfühler (DS1820) platziert.

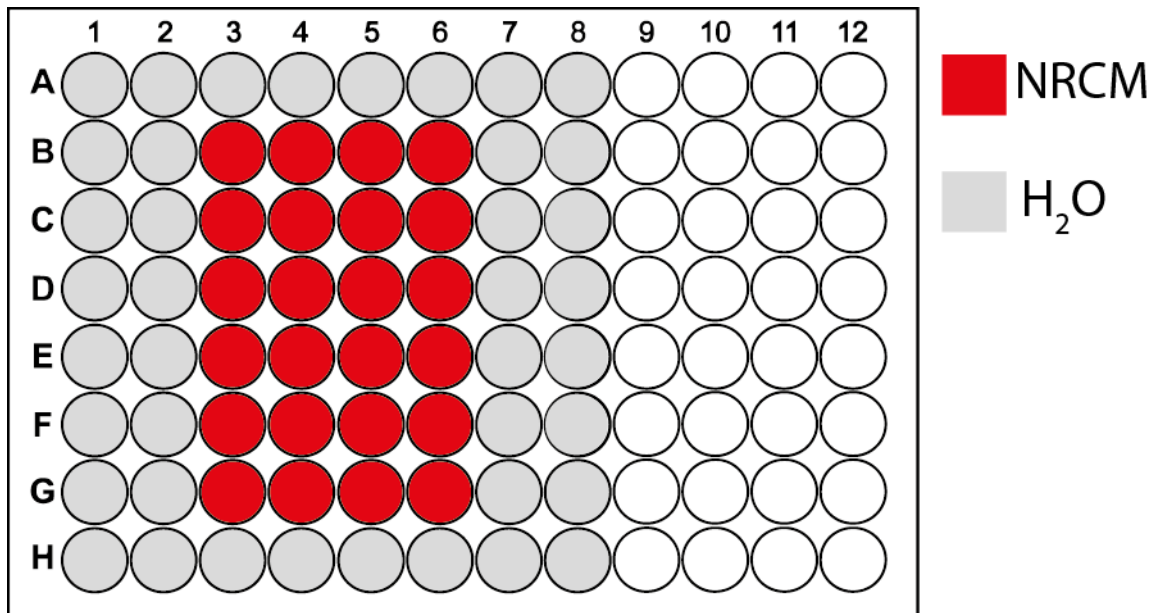


Abbildung 9: Bestückung 96-Näpfchen Platte

Das Aussäen der Zellen erfolgte durch Nadine Yurdagül-Hemrich (30 000 Zellen pro Näpfchen in 200 µl MEM Medium (5 % FCS)).

3.2 Herstellung der Adenoviren und Transduktion NRCM

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden von Nadine Yurdagül-Hemrich unter Verwendung des Gateway-Systems (Invitrogen) unter Vorgaben des Herstellers erzeugt. Zwei Austauschreaktionen bilden die Basis dieses Systems.

3.2.1 Transduktion

Zur adenoviralen Infektion wurden die NRCM für 20 Stunden (96 - und 12-Näpfchen Platten) bzw. 44 Stunden (Deckglas) in 5 % FCS-haltigem MEM Medium kultiviert und anschließend mit Adenoviren infiziert. Zur Transduktion wurde eine Viruskonzentration mit einer Verdünnung von $1:4 \times 10^4$ oder $1:5 \times 10^4$ Verdünnung auf die Zellen gegeben. Nach 12 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf 5 % FCS MEM (96-Näpfchen Platten) bzw. 1% FCS MEM (Deckgläser, 12-Näpfchen Platten). Dreißig Stunden nach dem zweiten

Mediumwechsel war, wie in Kontrollblots gezeigt, eine ausreichende Proteinexpression der eingebrachten Mutante erreicht und es konnte mit den Messungen begonnen werden.

3.2.2 Expression von Proteinen in *E. coli*

Bis zum Versuchsbeginn wurden die kompetenten *E. coli* bei -80 °C gelagert. Für die Transformation des *E. coli* Stammes BL21 wurden 200 µl Zellsuspension mit 200 ng Plasmid-DNA über 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Hitzeschock bei 42 °C über einen Zeitraum von 50 Sekunden und sofortiger anschließender einminütiger Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte die Inkubation über einen Zeitraum von 50 Minuten bei 37 °C. Die transformierte Bakterienkultur wurde bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im verbliebenen Restpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Ampicillin-haltigem LB-Agar-Medium (1,5 % Agar in LB Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium	Peptone	16 g/l
	Hefe	10 g/l
	NaCl	5 g/l
LB-Platten	Agar	12 g/l
	Ampicillin	0,01 % (m/v)

Ein Volumen von 10 ml LB-Medium, versetzt mit 10 µl Ampicillin, wurde mit einer gepickten Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt.

Die Bakterienanzucht erfolgte in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben in 400 ml Ampicillin-haltigem (1:1000) LB-Medium. Die Kulturen wurden mit 4 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bei 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches bei BL21 Zellen den Lac-Repressor inaktiviert, wurde die Proteinsynthese gestartet [Daber, Stayrook et al. 2007, #145]. Die Zellen wurden unter unveränderten Bedingungen für weitere 6 Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 Minuten), in Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Proteinreinigung

Puffer

Puffer 1	20 mM Tris + 300 mM NaCl + 1:2000 β -Mercaptoethanol
Puffer 2	20 mM Tris + 500 mM NaCl + 1:2000 β -Mercaptoethanol
pH	7,6

Die Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 15 ml Puffer 1 resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurde die Suspension unter ständiger Kühlung sonifiziert (Bandelin Sonoplus HD200; 3 Mal 15 Stöße, MS 72/D, 30 %). Die Suspension wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckman L70) bei 40 000 rpm, 4 °C unter Vakuum 60 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend sofort in eisgekühlte 15 ml Falkons überführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels einer Nickel-Nitrilotriacetat-Affinitätschromatographie. Mit Histidinen markierte Proteine sind in der Lage zweiwertige Kationen wie Ni^{2+} zu komplexieren. Bei der Nickel-Nitrilotriessigsäure Chromatographie (Ni-NTA-Chromatographie) sind zweiwertige Nickel-Kationen an NTA gebunden, welche ihrerseits an die Agarosematrix gekoppelt ist. Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die freien Bindungsstellen des Ni^{2+} -Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch sie immobilisiert werden. Imidazol, Bestandteil der Seitenkette des Histidins, geht mit Nickelionen ebenfalls eine Bindung ein und kann, in höheren Konzentrationen durch kompetitive Verdrängung, zur Freisetzung der gebundenen Proteine (Elution) verwendet werden. Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden Säulen (Poly-Prep Chromatography Columns – Bio-Rad) mit ca. 1,5 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen) befüllt und mit Puffer 1 äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinsuspension auf die Säulen überführt. Die Säule wurde anschließend fünfmalig mit Puffer 2 und dreimalig mit Puffer 1 mit je 10 ml gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 2 ml 150 mM Imidazol (gelöst in Puffer 1) versetzt und für eine Stunde bei 4 °C rotiert. Durch kompetitive Verdrängung wurde das Polyhistidin-markierte Protein freigesetzt. Das Protein wurde in einen Amicon Ultra Zentrifugal Filter (Millipore) eluiert, die Probe aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Kit (siehe 2.2) untersucht und die Reinheit über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung kontrolliert.

3.3 Quantifizierung der Proteinexpression

3.3.1 Probengewinnung

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus NRCM wurden jeweils 500 000 Zellen/Näpfcchen auf einer 12-Näpfcchen Platte ausgesät. Die Lysate wurden 30 Stunden nach Behandlung mit Adenoviren oder anderen Substanzen hergestellt. Nach Absaugen des Mediums wurden 150 µl eisgekühlter Auftragspuffer zugegeben und die Zellen 15 Minuten bei 4 °C lysiert. Im Anschluss wurde der Zellrasen abgeschabt und sonifiziert (Bandelin Sonoplus HD200; 3 Stöße, MS 72/D, 30 %). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit dem BCA Protein Assay Kit® (Pierce). Das System beruht auf einer Reduktion von zweiwertigem Kupfer in alkalischer Lösung zu einwertigem Kupfer, welches dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) und dem Protein in einer Komplexreaktion einen violetten Farbstoff bildet. Dieser kann photometrisch bei 562 nm in einer Extinktionsmessung (SPECTRAMax Plus 384, Molecular Devices) vermessen werden. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine Standardreihe mit bekannter BSA-Konzentration mit vermessen. Alle Proben wurden in Triplikaten auf einer 96-Näpfcchen Platte aufgetragen.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wandern geladene Teilchen in einem durch Gleichspannung erzeugten elektrischen Feld, wobei das Gel als Trägermedium für die zu untersuchenden Proteine fungiert. Die Gelmatrix, welche aus den Monomeren Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid besteht, ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe in einem Bereich von 10 – 200 kDa [Laemmli 1970, #146]. Dabei wirkt das Gel als molekulares Sieb: seine Porengröße bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Proteine im elektrischen Feld. Die Porengröße lässt sich durch die Mengenanteile der beiden Monomere steuern: ein vermehrter Einbau des bifunktionellen Monomers N,N'-Methylenbisacrylamid ermöglicht eine erhöhte Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Polymerketten und führt damit zu einer dichteren Vernetzung. Neben den eingesetzten Monomeren entscheidet der Anteil der Monomere am Gesamtvolumen des Gels über die Porengröße. In der vorliegenden Arbeit kamen 12,5 %-SDS-Gele zum Einsatz.

Die Polymerisierung wird durch Startradikale eingeleitet, welche aus einer Wechselwirkung zwischen Ammoniumperoxodisulfat (APS) und TEMED hervorgehen: TEMED begünstigt den Zerfall von APS in Sulfatradikale, selbige entziehen TEMED ein Elektron und bilden dadurch ein Startradikal [Werner A. Eckert 1997, #147].

Um Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufzutrennen, werden diese mit dem negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt und dadurch denaturiert. Dadurch wird die Eigenladung des Proteins abgeschirmt und ein festes Ladungs-/Masse-Verhältnis gebildet.

Beim diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli [Laemmli 1970, #146] ist dem feinporigen Trenngel ein großporiges Sammelgel aufpolymerisiert – zudem unterscheiden sich Trenn- und Sammelgel durch unterschiedliche pH-Werte. Beim Trenngel ist der pH-Wert auf pH 8,8, beim Sammelgel auf pH 6,8 eingestellt. Der Elektrodenpuffer, welcher das Gel umfließt, besitzt, wie das Trenngel, einen pH-Wert von pH 8,8. Durch diesen Aufbau bewegen sich Cl⁻-Ionen aufgrund ihrer Ladung und geringen Größe, nach Anlegen einer Spannung, im elektrischen Feld schnell, während Glycinmoleküle bei den vorliegenden pH-Werten neutral geladen sind und sich kaum fortbewegen. Zwischen den weniger beweglichen Glycinmolekülen und den mobilen Chloridionen entsteht ein Raum mit geringer Ionendichte und damit einer geringeren elektrischen Leitfähigkeit. Da der Stromfluss über das gesamte Gel konstant bleibt, bildet sich hier gemäß dem ohmschen Gesetz ein höherer Spannungsgradient und damit ein besonders starkes elektrisches Feld, in welchem die SDS-maskierten Proteine konzentriert werden. Im Trenngel liegen Glycinmoleküle aufgrund des geänderten pH-Wertes negativ vor – sie überholen hier die Proteine, wodurch in diesem Bereich ein schwächeres elektrisches Feld vorliegt und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde der PeqGOLD Protein-Marker III (Peqlab) eingesetzt.

Ansatz für 12,5%ige Acrylamid Gele

<u>Trenngel</u>	Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,8 % (m/v))	42 % (v/v)
	4x Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS (pH 6,8) 0,4 % SDS (m/v))	25 % (v/v)
	TEMED	0,05 % (v/v)
	APS (10% (m/v))	0,655 % (v/v)
<u>Sammelgel</u>	Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0,8 % (m/v))	12,5 % (v/v)
	4x Trenngelpuffer (1,5 M TRIS (pH 8,8) 0,4 % SDS (m/v))	25 % (v/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
	APS (10 % (m/v))	1 % (v/v)
<u>4x Sammelgelpuffer</u>	SDS	14 mM
	Tris (3M), pH 8,8	50 % (v/v)
<u>4x Trenngelpuffer</u>	SDS	14 mM
	Tris (1 M) pH 6,8	50 % (v/v)
<u>10x SDS Puffer</u>	Tris	250 mM
	Glycin	2 M
	SDS	35 mM

3.3.4 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Der Transfer der nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine vom Elektrophoresegel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Immobilon-P), erfolgte durch erneute Elektrophorese. Die elektrisch negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld auf die PVDF-Membran und werden dort durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche immobilisiert. Die PVDF-Membran wurde 2 Minuten in Methanol aktiviert, das zurecht geschnittene Trenngel auf die PVDF-Membran zwischen in Blotpuffer eingeweichte Filterpapiere eingelegt und alle Luftblasen sorgfältig entfernt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 60 Minuten in einem Mini Trans-Blot Modul der Firma Bio-Rad.

Transferpuffer

Tris	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20 % (v/v)

3.3.5 Coomassie Färbung

Die aufgereinigte Probe wurde auf Eis mit eiskaltem PBS auf Konzentrationen von 2 µg/µl, 0,2 µg/µl und 0,02 µl verdünnt und Lämmli im Verhältnis 1:4 zugesetzt. Anschließend wurden je 20 µl der Probe in ein 12,5 % SDS Gel pipettiert und 45 Minuten bei 200 V im Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Daraufhin wurden Proteinexpression und Reinheitsgrad der Probe anhand einer Coomassie Färbung geprüft. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele 2 Stunden in der Coomassie Lösung geschwenkt und über Nacht entfärbt. Anschließend wurde das Gel auf einem, mit Cellophanfolie abgedeckten, Flachbettscanner (Canon 8800F) digitalisiert.

Coomassie-Lösung: 0,025 % (m/v) Coomassie G-250

10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber: 30 % (v/v) Methanol

5 % (m/v) Glycerin

3.3.6 Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach Transfer auf die PVDF-Membran wurde das gewünschte Protein durch Immundetektion sichtbar gemacht. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde mit Blockmilch bei Raumtemperatur inkubiert.

Blockmilch

Milchpulver	5 % (m/v)
NaCl	150 mM
Tris-HCl	10 mM (pH 7,4)
Tween 20	0,1 % (v/v)

Waschpuffer

Albumin Fraktion V	0,25 % (m/v)
NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM (pH 7,4)
Nonidet P40	0,2 % (v/v)

Im Anschluss wurde der in *bovine serum albumin* (BSA) gelöste Erstantikörper auf die Membran gegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch wiederholtes Waschen der Membran mit Waschpuffer wurden nicht-gebundene Erstantikörper entfernt. Danach wurde die Membran mit einem, in BSA gelösten, gegen das IgG der ersten Spezies gerichteten, Zweitantikörper für 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte abermals mehrmaliges Waschen, um ungebundene Zweitantikörper zu entfernen.

Tabelle 6: Tabelle verwendeter primäre und sekundärer Antikörper

Primäre Antikörper

Epitop	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Katalognr.
G _B (C-Terminus)	Kaninchen	1:5000	Santa Cruz	sc-378
RKIP E-17 (C-Terminus)	Ziege	1:2000	Santa Cruz	sc-5423
RKIP FL (AS 1-187)	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz	sc-28837
Phospho-RKIP (S153)	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz	sc-32622

Sekundäre Antikörper

Epitop	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Katalognr.
Ziegen IgG	Esel	1:5000	Santa Cruz	sc-2020
Ratten IgG	Ziege	1:7500	Dianova	111035144

Alle Zweitantikörper waren mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert, die in der Lage ist eine Fluoreszenzreaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid zu katalysieren. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion. Dabei reagiert die Peroxidase mit dem Luminol der Entwicklungslösung und der als

Verstärker fungierenden Cumarinsäure unter Bildung eines Chemilumineszenzsignals. Emittierte Photonen sind in der Lage einen aufliegenden Fotofilm (Fuji Medical X-Ray Film) zu schwärzen und so die Position des Antigens sichtbar zu machen [Ogata, Arakawa et al. 1983, #148]. Abhängig von der Stärke des emittierten Chemilumineszenzsignals wird die Expositionsdauer des Röntgenfilms in der Fotokassette gewählt. Die Intensitäten der einzelnen Banden lassen Rückschlüsse auf die Menge des detektierten Proteins zu und erlauben auf diese Weise eine vergleichende Quantifizierung der Proteinbanden.

Entwicklerlösung

Lösung A1	55 µl p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)
Lösung A2	125 µl Luminol (250 mM in DMSO)
Lösung A1+A2	in 12,5 ml Tris-HCl (100 mM, pH 8,3) verdünnen
Lösung B	7,5 µl H ₂ O ₂ (30% (v/v)) in 12,5 ml Tris-HCl (100 mM pH 8,3)

3.3.7 Proteinfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Detektion von Proteinen auf Acrylamidgelen wurden diese mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Nach 30-minütiger Färbung in Farblösung und anschließendem Entfernen der Hintergrundfärbung mit Entfärbelösung konnte das Gel zur Dokumentation eingescannt werden.

<u>Coomassie Färbelösung</u>	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie Blue R250	0,1 % (v/v)

<u>Entfärbelösung</u>	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

3.4 Messung der Spontankontraktilität von NRCM

Der Einfluss von Wildtyp RKIP sowie den phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} auf Spontankontraktionen NRCM wurde anhand einer präparierten 96-Näpfchen Platte (siehe 3.1.4) ermittelt. Hierfür wurde mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 135 – ZEISS) unter Verwendung eines 5 x Objektivs die spontan auftretenden Kontraktionen

in einem Nöpfchen gezählt. Anschließend wurden die β -Rezeptoren NRCM durch Zugabe von 50 nM Isoproterenol stimuliert. Nach zweiminütiger Inkubationszeit wurden die binnen einer Minute auftretenden Spontankontraktionen erneut gezählt. Um Temperaturänderungen zu vermeiden, welche das Messergebnis verfälschen könnten, wurde in den seitlichen, mit destilliertem Wasser gefüllten, Nöpfchen jeweils ein digitaler Temperatursensor DS1820 platziert. Eine Lampensteuerung regelte, abhängig von der gemessenen Temperatur je eine links- und rechtsseitig platzierte 150 W Infrarotlampe (Philipps). Dadurch konnte eine konstante Temperatur von 33 °C gewährleistet werden. Zusätzlich wurde nach jeder Messung die Temperatur im Well mit einem Handthermometer (Testo 925) erfasst und vermerkt.

3.5 Photometrische Messung des intrazellulären Calciumspiegels

Alle eingesetzten Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kardiomyozyten wurden einmalig mit 2,5 ml Ladepuffer gewaschen und für 15 Minuten mit 0,5 μ M Fura 2 bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert, erneut mit 2,5 ml Ladepuffer gewaschen und die Petrischale mit 5 ml Ladepuffer aufgefüllt.

<u>Ladepuffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	Glucose	5,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	pH	7,39
<u>Durchlaufpuffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	Glucose	5,5 mM
	CaCl ₂	1,2 mM
	pH	7,39

Fura 2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur nicht invasiven Darstellung des intrazellulären Calciumspiegels. Chemisch handelt es sich um einen Acetomethylester, welcher mit freiem Calcium einen Chelatkomplex bildet. Das Anregungsmaximum (*Excitation*) von ungebundenem Fura 2 liegt bei 340 nm, im Komplex mit Calcium liegt das Anregungsmaximum bei 380 nm. Das gemeinsame Emissionsmaximum befindet sich bei 510 nm. Fura 2 diffundiert ins Zytoplasma der Kardiomyozyten, wo endogene Esterasen die Acetoxymethylestergruppe abspalten. Dadurch werden Calcium-bindenden funktionelle

Gruppen aktiviert. Der Fluoreszenzfarbstoff ist nun in der Lage reversibel Calcium zu binden. Gleichzeitig ist Fura 2 in der aktivierten Form nicht länger in der Lage die Zellmembran zu permeieren, wodurch sich Fura 2 in der Zelle anreichert.

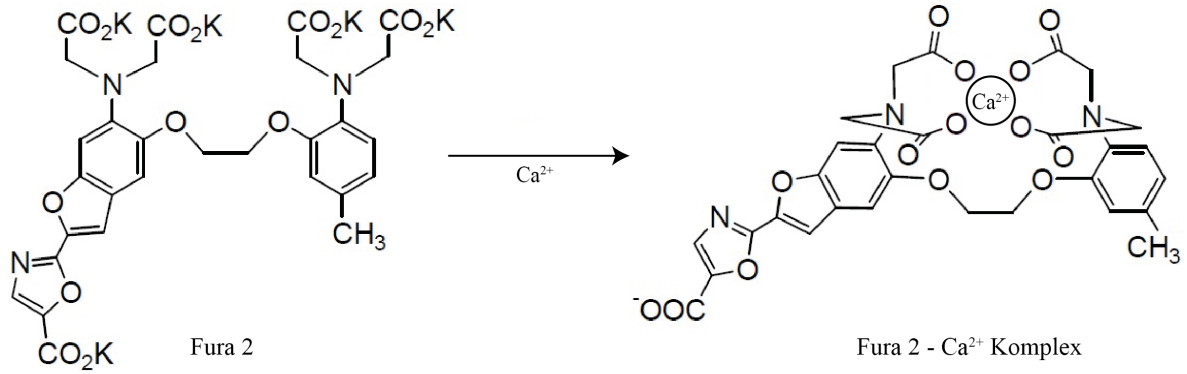


Abbildung 10: Konformationsänderung von Fura 2 bei Calciumbindung

Fura 2 ist ein Calciumindikator. Bei Calciumbindung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch Fura seine photometrischen Eigenschaften ändert.

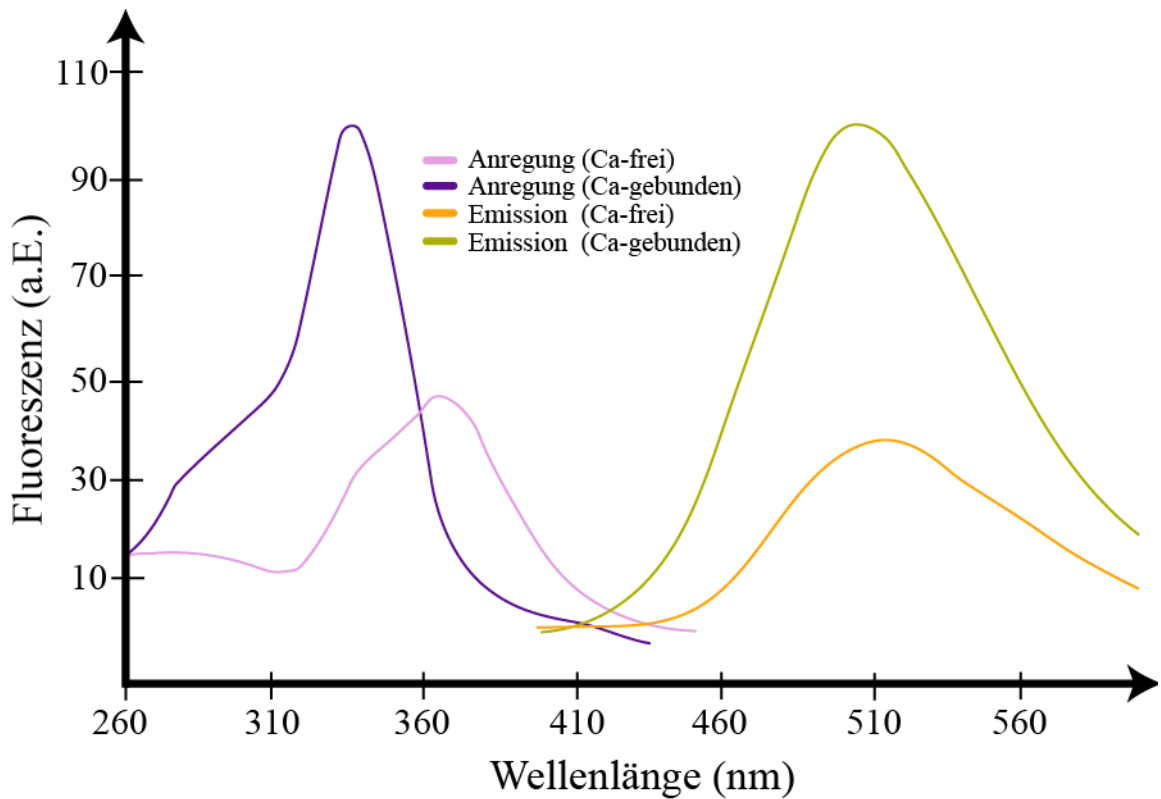


Abbildung 11: Anregungs- und Emissionsspektren von Fura 2

Die Abbildung zeigt Anregungs- und Emissionsspektren von Fura 2 im freien Zustand und bei Calciumbindung. Darstellung der Emission und Absorption in arbiträren Einheiten. Die Grafik ist modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Molecular Devices.

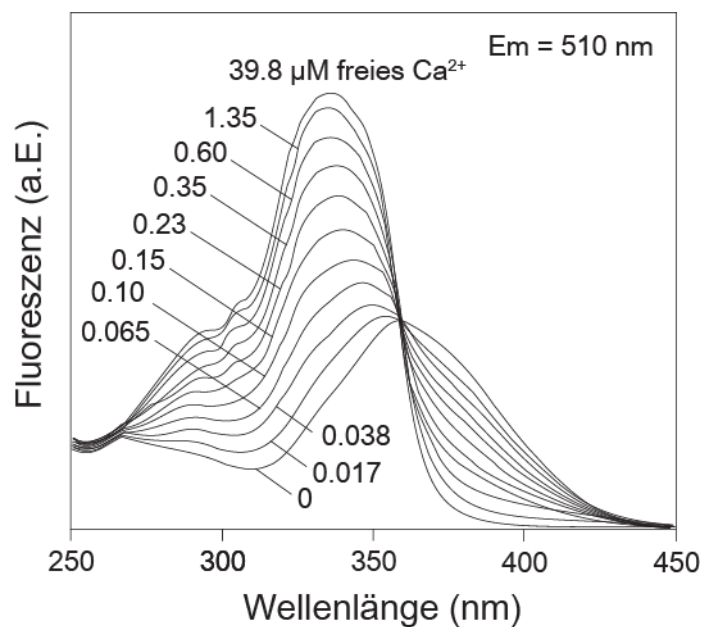


Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Fluoreszenz

Fluoreszenzspektrum von Fura 2. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs wurde die Emission unter Verwendung von acht Kalibrierlösungen mit unterschiedlichen Ca^{2+} Konzentrationen (0 – 39 μM) gemessen. Mit freundlicher Genehmigung von Lifetechnologies.

Da der Calciumspiegel über den Quotienten $\frac{\text{Fura 2 Emission 340 nm}}{\text{Fura 2 Emission 380 nm}}$ ermittelt wird, können verfälschte Messwerte aufgrund unterschiedlicher intrazellulärer Anreicherung oder Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs weitgehend vermieden werden.

3.5.1 Versuchsaufbau

Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit einem Mehrkomponentensystem von IonOptix (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA). Die Kontraktion der NRCM wurde durch einen elektrischen Impuls ausgelöst, dazu generierte ein Taktgeber (MyoPacer, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) an zwei Elektroden ein elektrisches Feld (20 Hz, 20 Volt). Das Deckglas wurde in ein inverses Mikroskop (AE31, Motic) eingespannt und mit auf 33 °C erwärmten Laufpuffer perfundiert (cFlow und mTCII, Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA). Auf der gegenüberliegenden Seite wurde das Perfusat von einer Schlauchpumpe (Minipuls2, Gilson) in einen Auffangbehälter gepumpt.

3.5.2 Erfassung intrazellulärer Calciumspiegel

Eine wechselnde Anregung von Fura 2 mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm wurde mit der IonOptix HyperSwitch *Dual Excitation Light Source* (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) erreicht. Das Licht einer 75 W Xenon Lampe wurde durch eine Sammellinse gebündelt und auf einen schnell beweglichen Spiegel abgelenkt. Je nach Position des Spiegels passiert das Licht ein optisches System mit Lichtfilter, welches nur durchgängig für Licht der Wellenlänge 340 nm [Naghavi M #149] (Abbildung 13: Lichtwege im Hyperswitch Pfad 1) oder Licht der Wellenlänge 380 nm [Naghavi M #149] (Abbildung 13: Lichtwege im Hyperswitch Pfad 2) ist. Anschließend vereinen sich beide Pfade und das Licht wird durch einen Flüssiglichtleiter zur Messkammer geleitet.

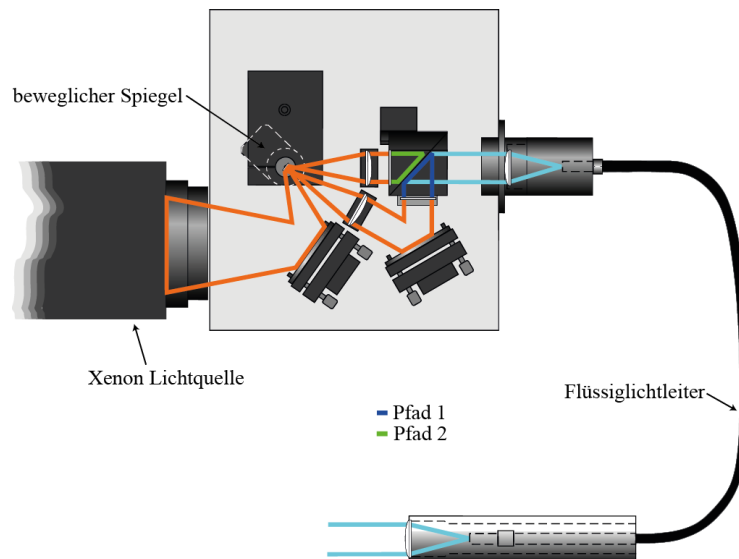


Abbildung 13: Lichtwege im Hyperswitch

Um Fura 2 in schnellem zeitlichem Wechsel mit UV Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm anregen zu können wurde ein Hyperswitch eingesetzt, dessen Lichtwege in obiger Abbildung dargestellt sind. Grafik modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von IonOptix.

Das Anregungslicht wechselte zwischen den beiden Wellenlängenpaaren 250 Mal pro Sekunde, wodurch eine hohe zeitliche Auflösung des gemessenen Calciumspiegels erreicht werden konnte.

Das vom angeregten Fura 2 emittierte Licht (violetter Pfad Abbildung 14) wurde von einem dichromatischen Spiegel abgelenkt, in einen Photomultiplier (PMT) verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, von einer Steuereinheit weiterverarbeitet (Fluorescence System Interface; IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) und an den Computer ausgegeben und von einer Software (IonWizard 6.4) interpretiert und dargestellt.

Zur visuellen Untersuchung der Zellen wurde die Probe mit einem Licht längerer Wellenlänge bestrahlt, welches den dichromatischen Filter passierte und die Fura 2 Messung nicht beeinflusste (roter Pfad Abbildung 14).

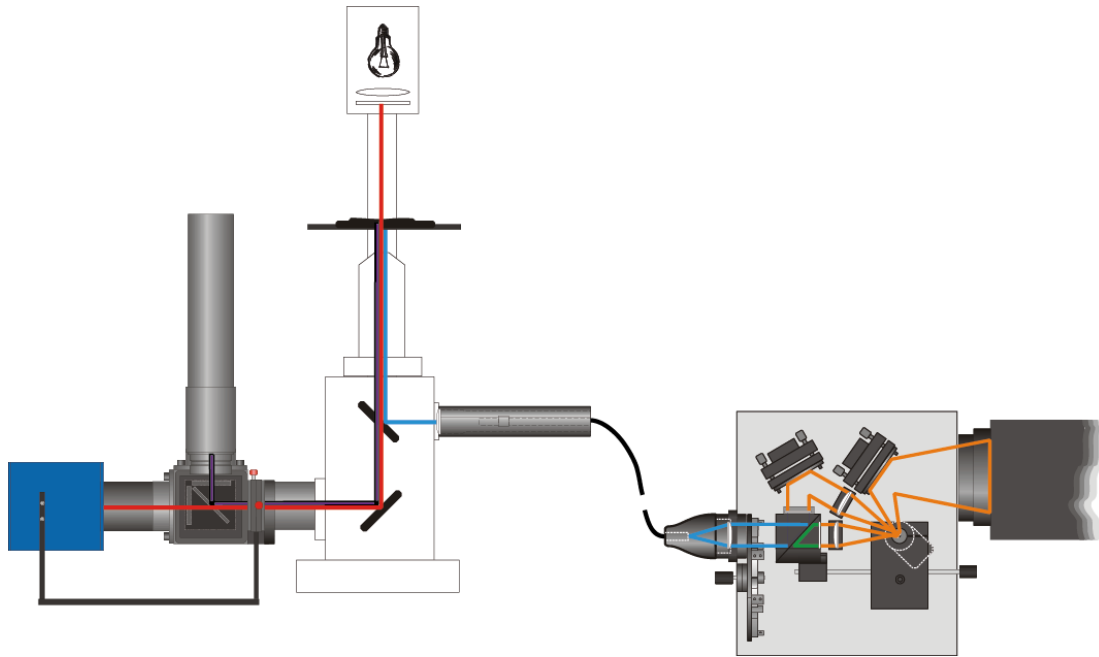


Abbildung 14: Lichtwege bei der Calciumspiegelmessung

Darstellung der Lichtwege: Fura 2 wird mit UV-Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm angeregt (blau), worauf Fura 2 Licht der Wellenlänge 510 nm emittiert (violett). Dieses wird von einem dichromatischen Spiegel auf einen Photomultiplier abgelenkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches mittels der Software IonWizard 6.4 ausgewertet wurde. Unabhängig davon konnten die NRCM mit der MyoCam visuell dargestellt werden. Dazu wurde Infrarotlicht (rot) eingesetzt. Grafik modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von IonOptix.

NRCM auf dem Deckglas wurden zunächst durch das Lichtmikroskop betrachtet und kontrahierende Bereiche identifiziert. Sobald der Durchlaufpuffer in der Kammer eine Temperatur von 33 °C erreichte, konnte die Messung begonnen werden. Pro Messung wurde 60 Sekunden die Kontraktion in IonWizard 6.4 aufgezeichnet, pro Deckglas wurden 6 Messungen durchgeführt. Zudem wurde das Hintergrundrauschen aufgezeichnet. Dazu wurden vor Beginn der 6. Messung Bereiche des Deckglases vom Zellrasen freigekratzt und einige Sekunden die Fluoreszenz eines zellfreien Arealis erfasst – das hierbei gemessene Signal dient als Basalsignal. Die dabei aufgezeichneten Fluoreszenzwerte wurden bei der Auswertung in IonWizard eingegeben und zur Bestimmung des Calciumspiegels berücksichtigt. IonWizard stellt die Calciumkonzentration als Funktion der Zeit dar. Außerdem ermöglicht das Programm zahlreiche Kurvenparameter zu ermitteln. Folgende Parameter wurden in dieser Arbeit berücksichtigt.

Kurvenparameter

Beschreibung der Kurvenparameter, frei übersetzt aus dem Handbuch „*Transient Analysis Parameters*“ von IonOptix.

Peakhöhe (peak h)

Als Peakhöhe wird die Differenz zwischen maximaler Auslenkung des Signals und Nulllinie bezeichnet.

Zeit zum Maximalausschlag (*time to peak*)

Die Zeit vom Beginn des Signalanstiegs bis zum Erreichen der maximalen Peakhöhe wird durch „*time to peak*“ beschrieben. Dieser Parameter ermöglicht die Beurteilung der Geschwindigkeit mit der Calcium an Fura 2 bindet bzw. den zeitlichen Verlauf der Calciumfreisetzung während der Kontraktion.

Zeit zur Nulllinie (*time to baseline*)

Die Zeit, die das Signal von seinem Maximalwert bis zur Nulllinie benötigt, wird mit „*time to baseline*“ beschrieben. Dieser Parameter charakterisiert den zytosolischen Calciumabfall, im Zuge der relativen Relaxation und beschreibt damit die Calciumwiederaufnahme. Bei hohen Prozentwerten (*time to baseline* > 95 %) wird der Wert bis zum Beginn der nächsten Kontraktion nicht immer erreicht. Dadurch kann der Wert in diesen Fällen nicht immer erfasst werden.

3.6 Statistik

Alle aufgeführten Ergebnisse zeigen einen Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM). Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte unter Verwendung eines zweiseitigen t-Tests. Bei der Analyse von mehr als zwei Gruppen wurde eine ANOVA (*analysis of variances*) mit anschließendem Bonferroni-Test (*post-hoc* Test, Paarvergleich) verwendet. Wird die Varianzanalyse (ANOVA) signifikant, so interessieren im Anschluss oft noch die Paarvergleiche zwischen den einzelnen Gruppen. Wenn nach der ANOVA noch Paarvergleiche berechnet werden, handelt es sich um multiples Testen. Dadurch kumuliert der α -Fehler und dies muss korrigiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür

Bonferroni gewählt. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Zur Auswertung wurde die Software Prism 6 der Firma GraphPad eingesetzt.

3.7 *In vitro* Kinase Assay

Die im *in vitro* Kinase Assay eingesetzten Proteinkinasen PKC δ (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) sowie PKA wurden mit je 2 μ g Phosducin bzw. 1 μ g Wildtyp-RKIP, RKIP^{S153A}, bei Proben mit PKC 5 μ M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) sowie 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP für 30 Minuten bei 30 °C in 50 μ l Endvolumen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l 4x Lämmli gestoppt und 50 μ l des Reaktionsansatzes mittels SDS-PAGE getrennt, anschließend mit Coomassie gefärbt und mittels Autoradiographie unter Verwendung von Personal Molecular Imager (Bio-Rad) ausgewertet.

Kinase Assay Puffer

0,1 mM	CaCl ₂
3 mM	β -Mercaptoethanol
10 mM	MgCl ₂
10 μ l	[γ - ³² P]-ATP
500 μ M	ATP
20 mM	HEPES
2 mM	EDTA
pH	7,2

Proteinkinasen katalysieren eine reversible Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Tyrosin- und Histidinresten an ihren Zielproteinen, eine Reaktion, in welcher die γ -Phosphatgruppe von ATP auf das Zielprotein übertragen wird [Hastie, McLauchlan et al. 2006, #150]. Durch radioaktiv markiertes [γ -³²P]-ATP lassen sich erfolgte Phosphorylierungen mittels Radiographie nachweisen.

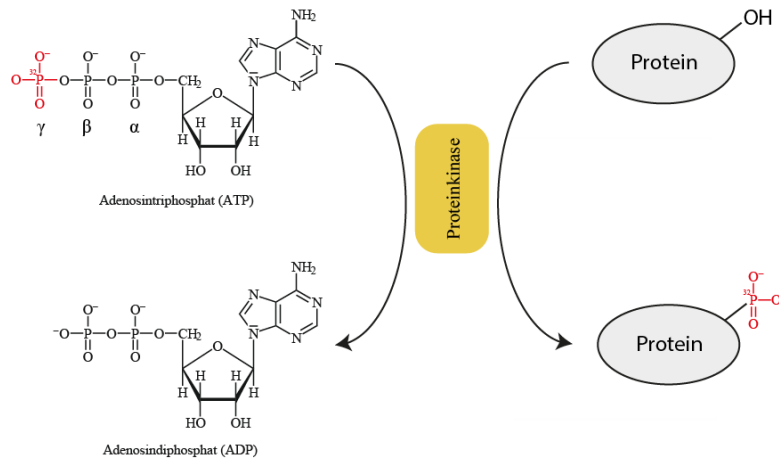


Abbildung 15: Schematische Darstellung Radioaktiv Kinase Assay

Proteinkinasen katalysieren eine reversible Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Tyrosin- und Histidinresten an ihren Zielproteinen, wobei die γ -Phosphatgruppe von ATP auf das Zielprotein übertragen wird. Durch radioaktiv markiertes [γ - ^{32}P]-ATP lassen sich erfolgte Phosphorylierungen mittels Radiographie nachweisen.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick

Bei chronischer Herzinsuffizienz führt eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch Stimulation von β -Adrenorezeptoren zu einer Steigerung der kardialen Kontraktion, wodurch der Körper einer verminderten kardialen Auswurfleistung entgegenwirkt. Eine dauerhafte Stimulation von β -Adrenorezeptoren führt zu Hypertrophie, Apoptose und Fibrose [Lorenz, Rosner et al. 2017, #151], [Engelhardt, Hein et al. 1999, #152], [Tacon, McCaffrey et al. 2012, #153]. Zudem führt eine chronische Stimulierung der β -Adrenorezeptoren zur Desensibilisierung und Internalisierung durch GRK2 und β -Arrestin wodurch eine Wiederherstellung des β -adrenergen Signalweges erschwert wird. RKIP ist ein Inhibitor von GRK2 und bietet dadurch die Möglichkeit Einfluss auf die kardiale Kontraktilität zu nehmen [Rockman, Koch et al. 2002, #154], [Raake, Vinge et al. 2008, #92].

Eine Phosphorylierung von RKIP an S153 durch die PKC führt zu einer Dimerisierung zweier RKIP Monomere [Deiß 2012, #155]. An S153 phosphoryliertes RKIP zeigt einen hemmenden Einfluss auf GRK2 [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106]. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine weitere mögliche Phosphorylierungsstelle von RKIP an S51 und S52 untersucht. Dazu wurde die Kontraktion NRCM analysiert, die Mutanten von RKIP exprimierten, an denen Serin durch ein nicht phosphorylierbares Valin ersetzt wurde. Erkenntnisse über Mechanismen, die eine Phosphorylierung von RKIP an S153 fördern und damit eine Hemmung von GRK2 begünstigen, könnten vor diesem Hintergrund bei der Entwicklung von Therapiestrategien bei Herzinsuffizienz einen hohen Stellenwert einnehmen. Daher wurde das Kontraktionsverhalten verschiedener RKIP Mutanten vergleichend analysiert.

4.2 Kontraktilitätsmessungen

Um die Kontraktilität verschiedener RKIP Mutanten vergleichen zu können, wurde zunächst eine ausreichende intrazelluläre RKIP Expression sichergestellt. Eine Überexpression von wildtypischem RKIP (im Folgenden als RKIP bezeichnet) und RKIP-Mutanten in NRCM wurde durch Transduktion der Zellen mit Adenoviren durchgeführt, die für RKIP, seine phosphorylierungsdefizienten Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} bzw. β -Galaktosidase (LacZ) kodieren. Der Kontrollvektor LacZ wird genau wie RKIP und die RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} transkribiert, die im Kardiomyozyten gebildete β -Galaktosidase hat in dieser Zelle allerdings keine physiologische Funktion, da es sich um ein art- und zweckfremdes Protein handelt. Das Mitführen einer Kontrolle soll sicherstellen, dass Effekte, die durch die

Überexpression von RKIP und seinen Mutanten provoziert werden, von Effekten unterschieden werden können, die durch das Einbringen fremder DNA in die Zellen hervorgerufen werden.

4.2.1 Expressionskontrolle und Infektionsbedingungen

NRCM wurden mit Adenoviren transduziert, welche die RKIP-Expression induzierten. Die Virusmenge wurde so gewählt, dass die intrazelluläre RKIP Menge, die endogen vorkommende Konzentration um den Faktor 3 überschritt. Für die anstehenden Kontraktionsversuche muss eine ausreichende Überexpression von RKIP sichergestellt werden. In Anlehnung an die in [Schmid, Neef et al. 2015, #111] verwendeten Protokolle wurde die Expression von RKIP nach 6 und 12 Stunden Transduktionszeit bestimmt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnte nach 6 und 12 Stunden eine gesteigerte Menge exogenen RKIPs nachgewiesen werden. RKIP besitzt ein Molekulargewicht von 21 kDa. Das viral eingebrachte RKIP besitzt einen Flag-Tag, wodurch sein Molekulargewicht höher ist. Dadurch kann im Western Blot die Expression von endogenem und rekombinantem RKIP separat evaluiert werden. In Abbildung 16 B wurden zur Transduktion von Wildtyp RKIP Virus in einer Verdünnung von $1:4 \times 10^4$ oder $1:5 \times 10^4$ auf die Zellen gegeben. Eine höhere Virusmenge führte hierbei zu einer höheren Konzentration an exogenem RKIP.

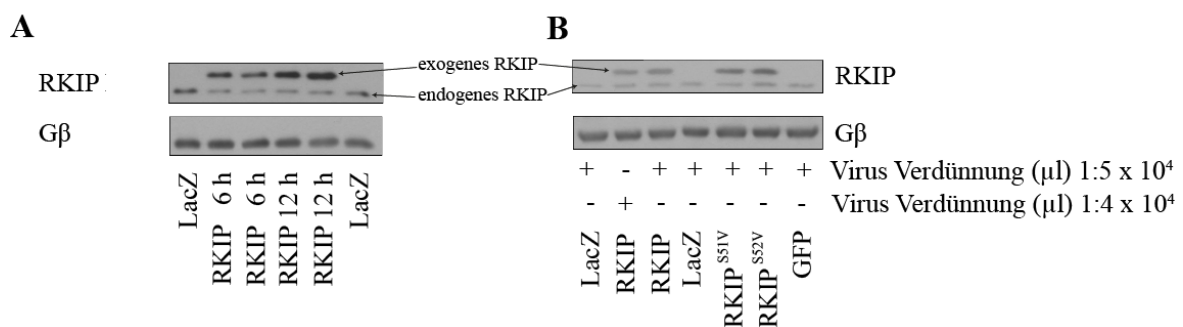


Abbildung 16: Immunoblot als Expressionsnachweis von RKIP in transduzierten NRCM

Expressionsnachweis in NRCM. Repräsentative *Western Blots* aus $n = 3$ Transduktionen (A) Zeitabhängige Expression von RKIP: NRCM wurden 6 bzw. 12 Stunden mit rekombinanten Adenoviren transduziert, lysiert und die Proteinexpression mittels SDS PAGE bestimmt. (B) Expressionskontrolle von RKIP (Wildtyp RKIP in zwei verschiedenen Viruskonzentrationen): RKIP besitzt ein Molekulargewicht von 21 kDa, Gβ weist ein Molekulargewicht von 37 kDa auf. Exogenes RKIP hat einen Flag-Tag und besitzt dadurch ein höheres Molekulargewicht, wodurch es im Western Blot vom endogenen RKIP unterschieden werden kann. Zum Nachweis von RKIP wurde der Antikörper RKIP E17 des Herstellers Santa Cruz verwendet, welcher gegen ein am C-Terminus gelegenes Epitop von RKIP gerichtet ist. Um einen etwaigen Einfluss der Adenoviren auf NRCM zu berücksichtigen, wurden die Kontrollzellen mit LacZ transduziert, ein Gen des Lactose-Operons aus *Escherichia coli*, welches für das Enzym β-Galaktosidase kodiert sowie das grün fluoreszierende Protein (GFP). Die Kontrollvektoren LacZ und GFP greifen wie der eingebrachte RKIP-Vektor in die Transkription ein. RKIP^{SV51} und RKIP^{SV52} bezeichnen an Position 51 bzw. 52 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutanten, in denen Serin an Position 51 bzw. 52 durch Valin ersetzt wurde.

4.2.2 RKIP Überexpression erhöht Kontraktionen nach Isoproterenolstimulation

Um einen quantitativen Einfluss einer RKIP Überexpression in NRCM auf das Kontraktionsverhalten festzustellen, wurden Spontankontraktionen vor und nach Stimulation mit 50 nM Isoproterenol gemessen. Die durchschnittliche basale Kontraktionsfrequenz der untersuchten NRCM lag bei etwa 40 Kontraktionen pro Minute. Als Negativkontrolle wurden mit LacZ transduzierte NRCM herangezogen. Für eine bessere Übersicht und um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messverfahren zu erreichen wurden die Werte normiert. Hierbei wurde das arithmetische Mittel aller gezählten Kontraktionen der Kontrollgruppe LacZ im unstimulierten Zustand mit 1 gleichgesetzt. Die übrigen untersuchten Versuchsreihen wurden hierzu ins Verhältnis gesetzt. In unstimulierten NRCM zeigte sich keine signifikante Abweichung der Spontankontraktionen zwischen der RKIP und der LacZ-Gruppe. Nach Stimulation mit 50 nM Isoproterenol zeigten sowohl die Kontrollgruppe als auch die mit RKIP transduzierten NRCM eine signifikant erhöhte Schlagfrequenz (Abbildung 17).

Bereits Lorenz *et al.* hatten die Kontraktion neonataler Kardiomyozyten nach Elektroporation mit spezifischen Antikörpern gegen GRK2 und RKIP untersucht. Eine Inhibition von GRK2 durch spezifische Antikörper führte zu einer erhöhten Schlagfrequenz der NRCM bei Stimulation mit 5 nM Isoproterenol, eine Hemmung von RKIP durch spezifische Antikörper führte zu einer verringerten Anzahl beobachteter Kontraktionen [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106].

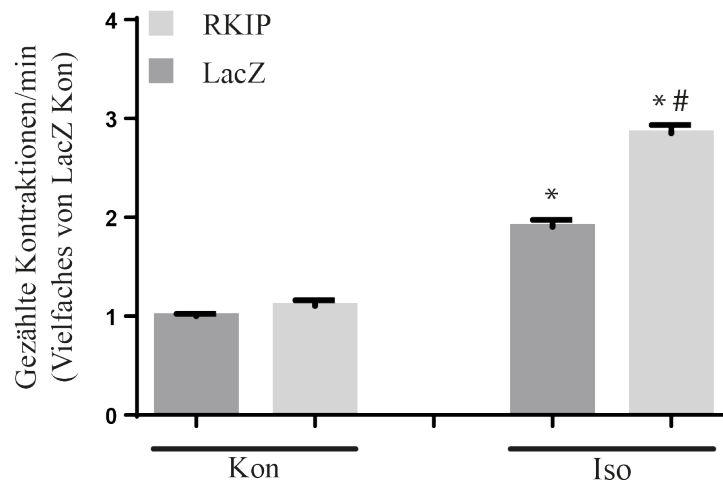


Abbildung 17: NRCM, die RKIP überexprimieren zeigen, nach Stimulation mit Isoproterenol gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte Schlagfrequenz

Ca. 30 000 neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) pro Nöpfchen wurden in 5 % FCS-haltigem Medium auf 96-Nöpfchen Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit einem für Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Wildtyp exprimierenden Adenovirus sowie die Kontrollgruppe mit LacZ (12 Stunden) inkubiert. Die Spontankontraktionen wurden bei konstant 33 °C über eine Minute erfasst. Anschließend wurden die NRCM mit 50 nM Isoproterenol stimuliert und die Spontankontraktionen nach 2 Minuten wiederum 1 Minute lang gezählt. Aufgetragen ist der Mittelwert der gezählten Kontraktionen aus LacZ Kon n = 5, RKIP Kon n = 5, LacZ Iso n = 5, RKIP Iso n = 5. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. * signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber LacZ Iso; p < 0,05.

Im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von RKIP die Kontraktilität NRCM nach Stimulation mit Isoproterenol signifikant erhöhen konnte, was im Einklang mit den bereits veröffentlichten Studien steht.

4.2.3 RKIP erhöht die Ca²⁺-Freisetzung und beschleunigt die Ca²⁺-

Wiederaufnahme

Zur qualitativen Untersuchung der Kontraktion wurden Calciumtransientenmessungen mit Fura 2 durchgeführt. Die Auswertung von Calciumtransienten erlaubt Rückschlüsse auf die Kontraktion einer Muskelzelle: zu Beginn einer Kontraktion strömt Calcium ins Zytosol ein, bei Beendigung der Kontraktion wird Calcium aus der Zelle eliminiert bzw. ins SR aufgenommen. Die Calciumtransienten können anhand eines, ins Zytoplasma eingebrachten, calciumsensitiven Farbstoffes (Fura 2) visualisiert werden. Durch Fura 2 Messungen konnte der zeitliche Verlauf von Calciumfreisetzung ins Zytosol und Calciumabfall dargestellt werden und Rückschlüsse auf die Kinetik am Calciumhaushalt beteiligter Proteine gezogen werden. Die Kontraktion wurde durch Anlagen einer Spannung (20 V, 0,5 Hz) ausgelöst.

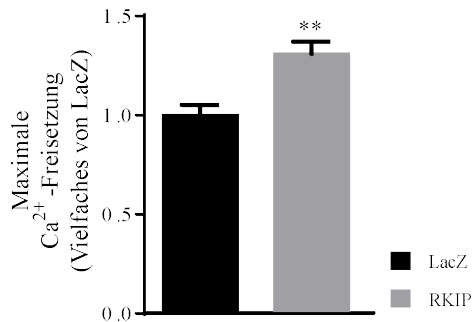
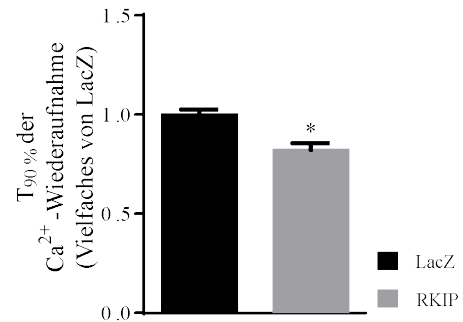
A**B**

Abbildung 18: Mit RKIP transduzierte NRCM zeigen eine erhöhte Ca²⁺ Freisetzung und beschleunigte Ca²⁺ Wiederaufnahme

Untersuchungen der Calciumtransienten von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM). **A** Dargestellt ist der Mittelwert der maximalen Amplitude der Calciumtransienten, von LacZ und RKIP transduzierten Kardiomyozyten bei elektrisch induzierter (20 V, 0,5 Hz) Kontraktion - dargestellt als Vielfaches der LacZ-transduzierten Kontrolle (Mittelwert aus LacZ, RKIP, n = 4). Die LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. **B** Zeit bis zu 90 %iger Rückkehr (T_{90%} %) zur Basallinie des Calciumtransienten von LacZ und RKIP transduzierten Kardiomyozyten dargestellt als Vielfaches der LacZ-transduzierten Kontrolle (Mittelwert aus LacZ, RKIP, n = 4). Die LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. ** signifikant gegenüber der Kontrollgruppe LacZ; p < 0,05; * signifikant gegenüber der Kontrollgruppe LacZ; p < 0,05.

Beim Vergleich der maximalen Calciumamplituden in mit RKIP transduzierten NRCM und der mit LacZ transduzierten Kontrollgruppe zeigen die RKIP transgenen NRCM einen höheren Calciumgehalt. Dies deutet auf die Möglichkeit einer stärkeren Kontraktion der mit RKIP transduzierten NRCM hin (siehe Abbildung 18 A). Die mit RKIP transduzierten NRCM zeigen bei qualitativer Analyse der Kontraktion bei Beendigung des Kontraktionsvorganges einen schnelleren Abfall freien Calciums (siehe Abbildung 18 B), was darauf hindeutet, dass die Calciumwiederaufnahme in das SR und damit die SERCA-Aktivität erhöht ist. Eine Erklärung könnte die Phosphorylierung von PLN durch die PKA liefern – in phosphoryliertem Zustand verliert PLN seinen hemmenden Einfluss auf SERCA. PKA wird nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren aktiviert (β -AR-G α_s -PKA). Eine erhöhte Aktivität von β -AR kann durch eine RKIP Überexpression erreicht werden: RKIP liegt im Herzen vorwiegend in phosphorylierter Form vor - phosphoryliertes RKIP bildet Dimere [Deiß 2012, #155] und inhibiert in dieser Form GRK2 [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106], wodurch GRK2 ihren hemmenden Einfluss auf β -AR verliert.

4.3 RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} zeigen keinen Einfluss auf die Kontraktilität

Da in einem Artikel der Online Ausgabe 2014 des FASEB Journal [Colin Ong 2014, #156] von einer PKA-seitigen Phosphorylierung des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) an Position 51 berichtet wird, sollte diese Phosphorylierungsstelle in dieser Arbeit näher untersucht werden. Zudem entschieden wir uns die nachfolgende Phosphorylierungsstelle an

Position 52 in gleicher Weise zu untersuchen. Um über die Bedeutung dieser potenziellen Phosphorylierungsstelle auf die Kontraktilität von NRCM Aufschluss zu erhalten, wurden RKIP Mutanten eingesetzt, bei denen die Serine an Position 51 bzw. 52 durch ein nicht phosphorylierbares Valin ersetzt wurden (RKIP Mutante im Folgenden als RKIP^{S51V} bzw. RKIP^{S52V} bezeichnet).

Die Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung an Tyrosin-, Serin- und Threoninresten erfolgt durch Proteinkinasen. Bei Erkennung der Substrate durch Proteinkinasen spielen spezifische Aminosäureabfolgen in der Nähe der Phosphorylierungsstelle – das Phosphorylierungsmotiv – eine entscheidende Rolle [Amanchy, Periaswamy et al. 2007, #157].

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
P31044	FASTA	187	20,801
Last modified January 23, 2007. Version 3. Checksum: F2BF053FE34B8056			
<div style="text-align: center;"> 10 20 30 40 50 60 </div> <div style="text-align: center;"> MAADISQWAG PLSLQEVDEP PQHARVDYG GVTVDELGKV LTPTQVMNRP SSISWDGLDP </div> <div style="text-align: center;"> 70 80 90 100 110 120 </div> <div style="text-align: center;"> GKLYTLVLTD PDAPSRKDKP FREWHHFLVV NMKGNDISSG TVLSEYVGS PPKDTGLHRY </div> <div style="text-align: center;"> 130 140 150 160 170 180 </div> <div style="text-align: center;"> VWLVEQEQP LNCDEPILSN KSGDNRGKFK VESFRKKYHL GAPVAGTCFQ AEWDDSVPKL </div>			

Abbildung 19: Primärsequenz RKIP Rattus norvegicus (Ratte)

Primärsequenz von Ratten RKIP aus der Uniprot Datenbank. An Aminosäureposition 49 findet sich Arginin, gefolgt von Prolin an Aminosäureposition 50 sowie Serin an Aminosäureposition 51 und 52. Damit entspricht die Primärsequenz einer möglichen Phosphorylierungsstelle für die PKA. Quelle: <http://www.uniprot.org/uniprot/P31044> (24.12.2016)

Kinase	Phosphorylierungsmotive	Bekannte Substrate
PKA	Arg-X-Ser/Thr or Arg-Arg/ Lys-X-Ser/Thr	AID, bAD, calpain 2, CFTR, CREb, GRK2, GSK3, HSL, KCNN2, NFAT2 and VASP
PKC	Arg-Lys-X-Ser/Thr-X- Arg/Lys (for PKC α)	Adducin 1, gp130, GRK2, GSK3, IRS1, MARCKs, PKD, PDE3a, RAF1 and SHP1

Abbildung 20: Phosphorylierungsmotive von PKA und PKC

Bekannte Phosphorylierungsmotive von PKA und PKC [Pearce, Komander et al. 2010, #158]. Das hervorgehobene Phosphorylierungsmotiv findet sich in der Primärstruktur von RKIP wieder.

Die Primärstruktur von RKIP zeigt ein mögliches Phosphorylierungsmotiv von RKIP für die PKA an S51 (Abbildung 20). Spontankontraktionen und Calciumspiegelmessungen an RKIP^{S51V} bzw. RKIP^{S52V} exprimierenden NRCM wurden untersucht. Spontankontraktionen wurden vor und nach Stimulation mit 50 nM Isoproterenol gemessen. Wie Abbildung 21 zeigt, konnten in unstimulierten NRCM keine signifikanten Unterschiede zwischen RKIP-, RKIP^{S51V}-, RKIP^{S52V}- und LacZ überexprimierenden NRCM beobachtet werden. Nach Stimulation mit 50 nM Isoproterenol zeigten alle Gruppen gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Schlagfrequenz. Innerhalb der mit Isoproterenol stimulierten Gruppen zeigte die mit RKIP transduzierte Gruppe RKIP eine signifikant erhöhte Schlagfrequenz. Die RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} zeigten eine mit der Kontrollgruppe (LacZ) vergleichbare Kontraktilität.

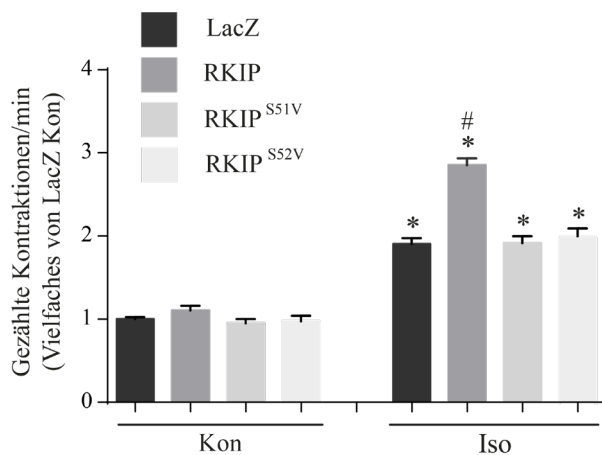


Abbildung 21: Neonatale Rattenkardiomyozyten, die RKIP überexprimieren, zeigen nach Stimulation mit Isoproterenol gegenüber der Kontrollgruppe sowie den RKIP Mutanten RKIP^{SV51} und RKIP^{SV52} eine erhöhte Schlagfrequenz.

Mit LacZ, RKIP, RKIP^{SV51} und RKIP^{SV52} (RKIP^{SV51} und RKIP^{SV52} bezeichnen an Position 51 bzw. 52 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutanten, in denen Serin an Position 51 bzw. 52 durch Valin ersetzt wurde.) transduzierten Kardiomyozyten. Die Spontankontraktionen wurden bei konstant 33 °C über eine Minute erfasst. Anschließend wurden die NRCM mit 50 nM Isoproterenol stimuliert und die Spontankontraktionen nach zwei Minuten wiederum eine Minute lang gezählt. Aufgetragen ist der Mittelwert der gezählten Kontraktionen in Abwesenheit von Isoproterenol: LacZ Kon, RKIP Kon, RKIP^{SV51} Kon und RKIP^{SV52} Kon n = 4 sowie nach Stimulation mit Isoproterenol LacZ Iso, RKIP Iso, RKIP^{SV51} Iso und RKIP^{SV52} Iso n = 4. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. * signifikant gegenüber den basalen Bedingungen (Kon); # signifikant gegenüber allen anderen Bedingungen; p < 0,05.

Die Daten stammen aus demselben Datensatz, der in Abbildung 17 verwendet wurde.

Analog zu 4.2.2 wurde auch bei den phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} eine qualitative Kontraktionsanalyse durchgeführt. NRCM, in denen Wildtyp-RKIP überexprimiert wurde, zeigen eine signifikant verkürzte Calciumwiederaufnahme, während eine Überexpression der RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} keine gegenüber der Kontrollgruppe veränderte Kinetik bei der Calciumwiederaufnahme zeigte. Die Calciumfreisetzung aus dem SR stellte sich bei Überexpression der RKIP Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} gegenüber der Kontrollgruppe LacZ weder beschleunigt noch verzögert dar. Die in Abbildung 22 und Abbildung 18 gezeigten Auswertungen basieren auf einem Datensatz.

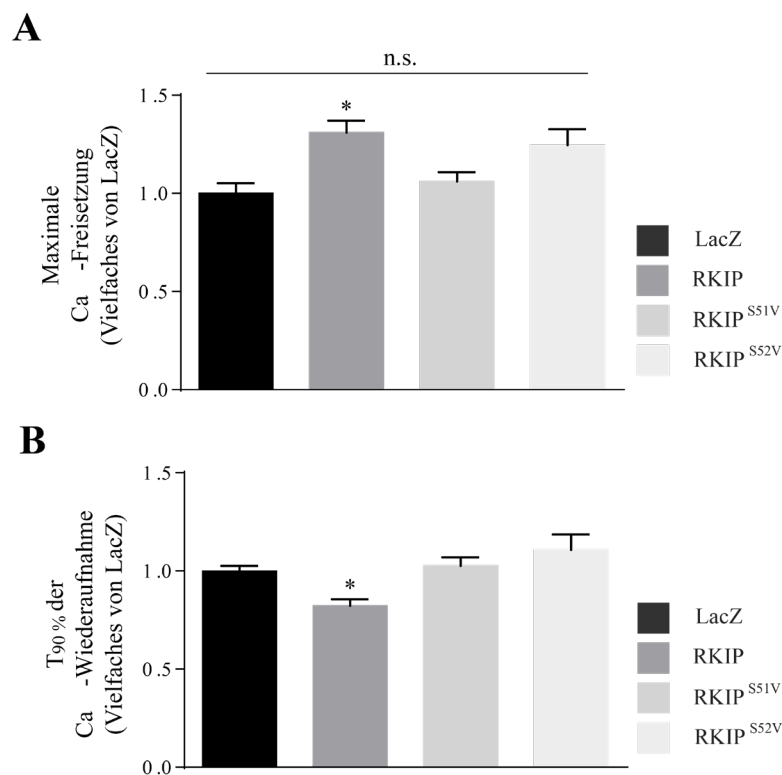


Abbildung 22: Calciumtransientenmessungen an NRCM

Untersuchungen der Calciumtransienten von NRCM. A Dargestellt ist der Mittelwert der maximalen Amplitude der Calciumtransienten, von LacZ, Wildtyp-RKIP, RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} transduzierten Kardiomyozyten bei elektrisch induzierter (20 V, 0,5 Hz) Kontraktion - dargestellt als Vielfaches der LacZ-transduzierten Kontrolle (Mittelwert aus LacZ, RKIP, RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} n = 4). Die LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. * signifikant gegenüber den übrigen Bedingungen; p < 0,05. B Zeit bis zu 90 % iger Rückkehr (T_{90%}) zur Basallinie des Calciumtransienten von LacZ und RKIP transduzierten Kardiomyozyten dargestellt als Vielfaches der LacZ-transduzierten Kontrolle (Mittelwert aus LacZ, RKIP, RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} n = 4). Die LacZ-Kontrolle ist dabei auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. * signifikant gegenüber den übrigen Bedingungen; p < 0,05.

Einen Nachweis, ob RKIP an S51 oder S52 phosphoryliert wird, kann durch Kontraktions- und Calciumtransientenmessungen nicht erbracht werden. Diese Frage sollte anhand eines *in vitro Kinase Assays* beantwortet werden.

4.4 *In Vitro* Kinase Assay

Eine Phosphorylierung an Position S51 oder S52 könnte die dreidimensionale Struktur von RKIP verändern. Im folgenden Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob eine Phosphorylierung an S51 oder S52 eine weitere Phosphorylierung an Position S153 durch die PKC erleichtert oder erschwert. Unter der Annahme, dass die Phosphorylierung an S51 oder S52 die Phosphorylierung an S153 beeinflusst, ist eine Änderung in der inhibitorischen Wirkung von RKIP auf die GRK2 und damit eine Änderung der Kontraktilität zu erwarten.

Um eine potentielle Phosphorylierung an S51 und S52 genauer zu untersuchen, entschieden wir uns einen Radioaktivassay mit Wildtyp-RKIP und den RKIP^{S51V} bzw. RKIP^{S52V} Mutanten durchzuführen. Durch radioaktiv markiertes [γ -³²P]-ATP lassen sich erfolgte Phosphorylierungen mittels Autoradiographie nachweisen. Geht man davon aus, dass die PKA RKIP an Position S51 oder S52 phosphoryliert, müsste RKIP bei Phosphorylierung in Anwesenheit von [γ -³²P]-ATP ein Autoradiographiesignal zeigen, wohingegen eine Schwärzung radiosensitiver Filme bei Verwendung der phosphorylierungsdefizienten Mutante RKIP^{S51V} bzw. RKIP^{S52V} ausbleiben würde.

Zunächst wurden RKIP und eine an der Aminosäureposition 153 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutante RKIP^{S153A} in *E. Coli* exprimiert und aufgereinigt, um diese Proteine *in vitro* einsetzen zu können. Eine Phosphorylierung von RKIP an der bekannten Phosphorylierungsstelle S153 führt zum Einbau von [γ -³²P] und zu einer Filmschwärzung in der nachfolgenden radiographischen Untersuchung. Um weitere Phosphorylierungsstellen radiographisch untersuchen zu können wurde auf die an S153 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutante RKIP^{S153A} zurückgegriffen.

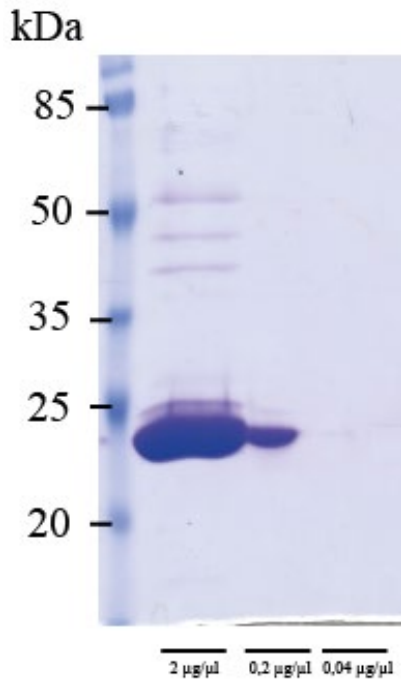


Abbildung 23: Coomassie Färbung der RKIP^{S153A} Mutante

12,5%ige SDS-PAGE einer Probe der aufgereinigten RKIP^{S153A} Mutante (bei 20 µl Probe: in der ersten Spur 40 µg Protein, in der zweiten Spur 4 µg Protein und in der dritten Spur 0,8 µg Protein) Coomassie gefärbt, um den Reinheitsgrad zu bestimmen.

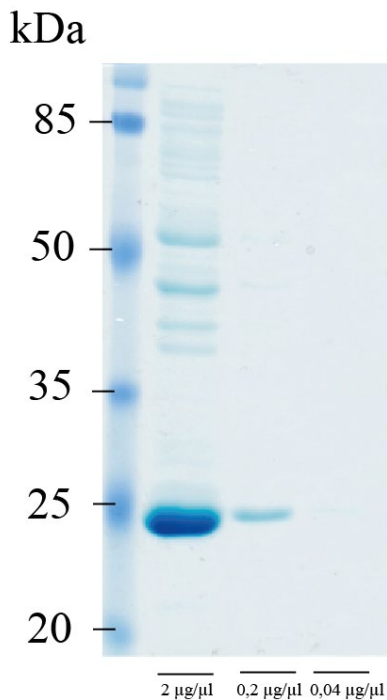


Abbildung 24: Coomassie Färbung RKIP

12,5 %ige SDS-PAGE einer Probe von aufgereinigtem RKIP (bei 20 µl Probe: in der ersten Spur 40 µg Protein, in der zweiten Spur 4 µg Protein und in der dritten Spur 0,8 µg Protein). Proteine mittels Coomassie gefärbt, um den Reinheitsgrad zu bestimmen.

Auswahl von mittels SDS-PAGE getrennten und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proben der aufgereinigten RKIP Mutante RKIP^{S153A} (Abbildung 23) und Wildtyp-RKIP (Abbildung 24). Besonders intensive Banden sind im Bereich 20 – 25 kDa zu erkennen. Dies zeigt einen hohen Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteine und damit eine erfolgreiche

Aufreinigung von Wildtyp-RKIP und RKIP^{S153A}. Die Mutanten V51 und V52 wurden mit ähnlichem Erfolg analog aufgereinigt.

Ein *in vitro* Kinase Assay bietet den Vorteil, dass alle Reaktionspartner bekannt sind und Interaktionen mit unbekanntem Komponenten weitestgehend ausgeschlossen werden können [Dickson 2008, #159]. Als die Phosphorylierung katalysierenden Proteinkinasen wurden die PKA sowie die PKC (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) untersucht. Um eine ordnungsgemäße Funktion der eingesetzten Proteinkinasen sicherzustellen, wurde für die PKA als Positivkontrolle das bekannte PKA-Substrat Phosducin [Pagh-Roehl, Lin et al. 1995, #160], für die PKC das bekannte PKC Substrat RKIP gewählt [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106]. Zur Aktivierung der PKC wurde jede Probe, die PKC enthielt, mit 5 μ M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und einem Phorbol-ester, welcher in der Lage ist PKC irreversibel zu aktivieren versetzt [Castagna, Takai et al. 1982, #161]. Um eine Phosphorylierung im *in vitro* Kinase Assay nachzuweisen, wurde allen Proben 10 μ Ci radiomarkiertes [γ -³²P]-ATP zugesetzt.

Tabelle 7: Anordnung der im *in vitro* Kinase Assay eingesetzten Substanzen

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
γ - ³² P (10 μ Ci)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PKA (0,6 μ g/ μ l) in μ l	1	5	1	1	5		1	5	1	1	1	
PKC δ (5 μ M)									+	+	+	+
PMA (5 μ M)									+	+	+	+
RKIP	+	+							+	+	+	+
RKIP ^{S153A} (1 μ g)							+	+		+		
Phosducin (2 μ g)				+	+	+						

PKA (0,6 μ g/ μ l) wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 μ l und 5 μ l) mit dem potentiellen Substrat RKIP (Wildtyp-RKIP) aufgetragen. Analog hierzu wurde die PKA (0,6 μ g/ μ l) mit der an Aminosäureposition 153 phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutante RKIP^{S153A} unter identischen Bedingungen untersucht. Als Positivkontrolle wurden Proben der PKA mit deren bekanntem Substrat Phosducin in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Um eine mögliche sequenzielle Phosphorylierung zu analysieren, wurden Proben mit RKIP, PKC sowie PKA eingesetzt. Ebenfalls untersucht wurde die Kombination von PKC, PKA sowie der an Position 153 phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutante RKIP^{S153A}. Um einen möglichen Hintergrund ausschließen zu können, wurde PKA alleine (ohne Substrat) und zudem beide Kinasen zusammen mit RKIP als Substrat untersucht, um eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Phosphorylierungen zu erforschen.

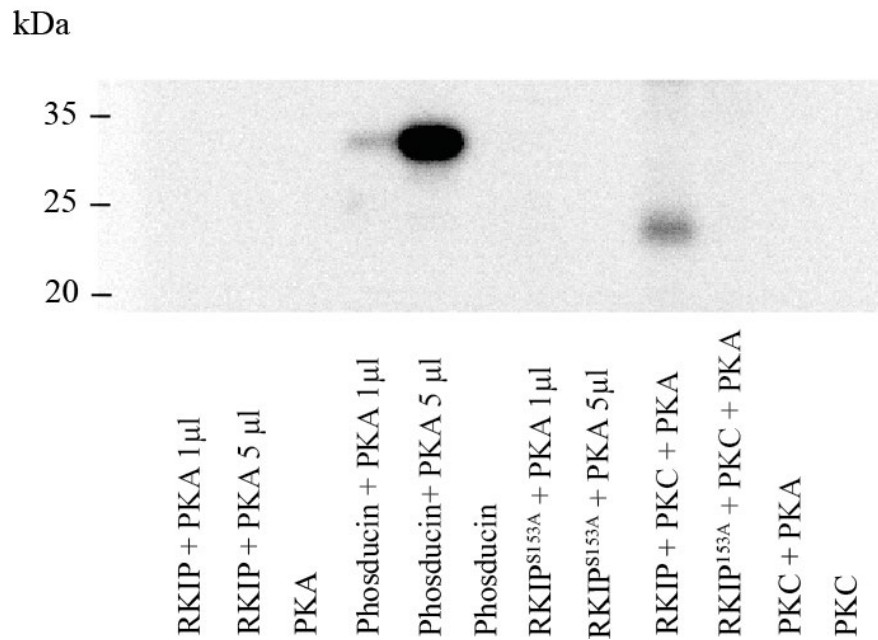


Abbildung 25: Untersuchung der Phosphorylierung von RKIP durch PKA

Repräsentative Radiographie des durchgeführten *in vitro* Kinase Assays. Als die Phosphorylierung katalysierenden Proteinkinasen wurden die Proteinkinase A (PKA) sowie die Proteinkinase C δ (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) untersucht. Um eine ordnungsgemäße Funktion der eingesetzten Proteinkinasen sicherzustellen, wurde für die PKA als Positivkontrolle das bekannte PKA-Substrat Phosducin, für die PKC das bekannte PKC Substrat RKIP gewählt. Zur Aktivierung der PKC δ wurde jede Probe, die PKC δ enthielt mit 5 μ M Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Phorbol-ester, welcher in der Lage ist PKC δ irreversibel zu aktivieren versetzt. Um eine Phosphorylierung im *in vitro* Kinase Assay nachzuweisen wurde allen Proben 10 μ Ci radioaktives [γ - 32 P]-ATP zugesetzt. Es wurde die Phosphorylierung von RKIP an der an S153 phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutante RKIP^{S153A} untersucht n = 3.

Nur bei den Positivkontrollen Phosducin + PKA sowie RKIP + PKC + PKA konnte eine Phosphorylierung detektiert werden. Die an Position 153 phosphorylierungsdefiziente RKIP Mutante RKIP^{S153A} zeigte keine signifikante Phosphorylierung, wodurch eine weitere Phosphorylierung, neben S153, von RKIP durch PKC oder PKA unter den hier genannten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Regulation von Proteinen durch Phosphorylierung

Neben Rezeptoren spielen Kinasen bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Diese sind in eukaryotischen Zellen in zahlreichen Signalwegen involviert [Braconi Quintaje and Orchard 2008, #162]. In den späten 1950er Jahren entdeckten Krebs und Fischer die Proteinphosphorylierung als wichtigen Kontrollmechanismus der intrazellulären Signaltransduktion: das reversible Übertragen einer Phosphatgruppe auf das Zielprotein führt zu einer Ladungs- oder Konformationsänderung, wodurch das Zielprotein aktiviert oder inhibiert werden kann [Krebs 1998, #163]. Für diese Entdeckung erhielten Krebs und Fischer 1992 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Derzeit wird angenommen, dass etwa ein Drittel aller eukaryotischen Proteine reversibel phosphoryliert und über diesen Mechanismus reguliert werden [Clemens 1996, #164]. Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass das Proteom einer menschlichen Zelle 500 000 mögliche Phosphorylierungsstellen beherbergt [Lemeer and Heck 2009, #165]. Proteinkinasen katalysieren das reversible Übertragen eines γ -Phosphates von ATP auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste der Proteinsubstrate. Beim Menschen werden vorwiegend Serinreste (86,4 %), gefolgt von Threoninresten (11,8 %) und Tyrosinresten (1,8 %) phosphoryliert [Olsen, Blagoev et al. 2006, #166].

Eine Phosphorylierung kann das Zielprotein stark beeinflussen. Durch Phosphorylierung können Proteine aktiviert werden, beispielsweise, indem sie eine allosterische Konformationsänderung auslöst: ein Beispiel hierfür ist die Glycogen Phosphorylase [Johnson and Barford 1993, #167]. Viele Kinasen müssen zunächst selbst phosphoryliert werden, bevor sie aktiv werden können [Russo, Jeffrey et al. 1996, #168]. Eine Phosphorylierung kann allerdings auch die Enzymaktivität herabsetzen, beispielsweise wenn die Phosphatgruppe das aktive Zentrum eines Enzyms sterisch blockiert ohne dabei eine Konformationsänderung herbeizuführen. Ein Beispiel hierfür ist die Isocitrat-Dehydrogenase [Hurley, Dean et al. 1990, #169]. Im Protein CDK2 behindert eine Phosphorylierung an Tyrosin 15 die Substraterkennung [Welburn, Tucker et al. 2007, #170]. Eine Phosphorylierung kann allerdings auch dazu führen, dass Erkennungsmuster zwischen Proteinen entstehen wie beispielsweise Phosphotyrosin in SH2 Domänen in Kinasen wie Src, Abl und Fes [Filippakopoulos, Kofler et al. 2008, #171]. In einigen Fällen konnte eine sequenzielle Phosphorylierung beobachtet werden: hier muss zunächst eine Phosphorylierungsstelle phosphoryliert werden, damit am selben Protein eine Erkennungssequenz für eine weitere Phosphorylierung entsteht. Beispiel hierfür ist das Substrat

APC (*adenomatous polyposis coli*) – ein Protein, welches durch CK1 und GSK3 phosphoryliert wird [Ferrarese, Marin et al. 2007, #172].

5.2 Regulation von RKIP durch Phosphorylierung

Auch RKIP wird durch Phosphorylierung reguliert. Ein gut charakterisierter Regulationsmechanismus stellt die Phosphorylierung von RKIP an S153 durch die PKC dar. Nach dieser Phosphorylierung dissoziiert RKIP von Raf1 und bindet an GRK2 [Lorenz, Lohse et al. 2003, #106].

Eine weitere Phosphorylierungsstelle konnte an S109 beobachtet werden. Nachdem murine Zellen mit *Vesicular stomatitis virus* (VSV) infiziert wurden, konnte eine Phosphorylierung von RKIP an S109 durch die TANK-binding kinase 1 (TBK1) beobachtet werden. Ohne eine virale Infektion konnte keine Phosphorylierung von RKIP an S109 nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung von RKIP an S109 führt zu einer verstärkten Interaktion zwischen RKIP und TBK1 und fördert die Autophosphorylierung von TBK1. TBK1 fördert die Synthese von Interferon I, wodurch die Produktion antiviral wirksamer Proteine induziert wird. Dieselben Autoren berichten über eine Phosphorylierung von RKIP an S52. Bei der phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutante RKIP^{S109A} konnte keine Interaktion mit TBK1 beobachtet werden. An S52 phosphorylierungsdefizientes RKIP^{S52A} zeigte bei der Interaktion mit TBK1 keine Unterschiede gegenüber RKIP [Gu, Liu et al. 2016, #173].

Shin *et al.* berichten über eine Phosphorylierung von RKIP durch phosphoryliertes ERK. Durch Phosphorylierungsversuche mit unterschiedlichen RKIP Mutanten konnte S99 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden [Shin, Rath et al. 2009, #174].

Diese Untersuchungen deuten an, dass RKIP mit verschiedenen Reaktionspartnern interagiert. Ein *in vitro* Kinase Assay ermöglicht Reaktionen in einer kontrollierten Umgebung zu untersuchen, wobei alle Reaktionspartner bekannt sind und Wechselwirkungen mit unbekanntem Komponenten weitestgehend ausgeschlossen werden können [Dickson 2008, #159]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Phosphorylierung von RKIP^{S153A} durch PKC oder PKA im *in vitro* Kinase Assay nicht beobachtet werden. Dennoch ist *in vivo* eine Phosphorylierung, beispielsweise durch andere Proteinkinasen, möglich. Denkbar ist auch seine sequenzielle Phosphorylierung von RKIP. Gu *et al.* vermuten, dass eine Phosphorylierung von RKIP zu einer Änderung der Tertiärstruktur führt [Gu, Liu et al. 2016, #173]. Auch Rosner *et al.* gehen davon aus, dass die dreidimensionale Anordnung von RKIP dessen Eigenschaften wesentlich beeinflusst [Skinner and Rosner 2014, #101], [Granovsky, Clark et

al. 2009, #175]. Bei Tomaten führt eine Mutation des pflanzlichen RKIP Analogons im DPDxP Motiv (entspricht bei RKIP P74L) zu schweren Veränderungen während der Entwicklung. So zeigen mutierte Pflanzen anstelle eines Sprosswachstums die Ausbildung von Blüten. RKIP mit einer P74L Mutation zeigen eine höhere Phosphorylierung an S153 [Pnueli, Gutfinger et al. 2001, #176] [Trakul and Rosner 2005, #177]. In NMR Experimenten konnte bei der P74 Mutante eine gesteigerte Flexibilität der Ligandenbindungstasche nachgewiesen werden. Bei an S153 phosphorylierungsdefizienten P74L Mutanten konnten die oben beschriebene Blüte nicht beobachtet werden – obwohl eine größere räumliche Distanz die beiden Regionen (S153 und P74) voneinander trennt, beeinflusst eine Mutation an P74L die Phosphorylierung an S153 [Colin Ong 2014, #156]. Im Review „*RKIP Structure Drives Its Function: A Three-State Model for Regulation of RKIP*“ beschreiben Skinner und Rosner diskrete Stadien von RKIP: unter bestimmten Bedingungen bindet RKIP an Raf (RKIP^{Raf}), nach Phosphorylierung durch die PKC bindet RKIP bevorzugt an GRK2 (RKIP^{GRK2}) [Skinner and Rosner 2014, #101].

In Zellen mit RKIP^{P74L} findet sich im Vergleich zu Zellen mit RKIP vermehrt RKIP^{GRK2}. Rosner konnte zeigen, dass auch RKIP^{P74L} an S153 phosphoryliert werden muss, damit RKIP dimerisiert. Eine Hypothese, wonach RKIP präferiert an GRK2 bindet, da bei der P74L Mutante die Raf-Bindungsstelle verändert ist [Rath, Park et al. 2008, #178], konnte Rosner damit als unwahrscheinlich einstufen [Skinner and Rosner 2014, #101]. Auch die Phosphorylierung kann die Proteinfaltung und damit die Tertiärstruktur eines Proteins beeinflussen [Bah, Vernon et al. 2015, #179]. Eine mögliche Phosphorylierung könnte RKIP daher in einer Tertiärstruktur stabilisieren, welche energetisch günstiger durch die PKC an S153 phosphoryliert werden oder aber diese Reaktion erschweren könnte. Posttranslationale Proteinmodifikationen oder die Bindung eines Liganden könnten Voraussetzung für eine Phosphorylierung sein. Mögliche Änderungen der räumlichen Konfiguration von RKIP durch Phosphorylierung könnten eine erhöhte oder verminderte Affinität von RKIP zu seinen Bindungspartnern Raf, GRK2 oder PKC bewirken und dadurch einen interessanten potentiellen pharmakologischen Ansatz darstellen.

5.3 Calciumcycling

Eine Betrachtung des Calciumtransienten erlaubt gegenüber dem Zählen von Spontankontraktionen die Analyse einzelner Kontraktionsabschnitte wie Systole und Diastole. Gwathmey *et al.* zeigten, dass Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz einen veränderten Calciumstoffwechsel aufweisen [Gwathmey, Copelas et al. 1987, #180]. Durch eine zeitliche Analyse der Calciumkonzentration während einer myokardialen Kontraktion kann ermittelt

werden ob und wie sich der Calciumstoffwechsel in Kardiomyozyten unter dem Einfluss von RKIP und RKIP-Mutanten verändert.

Abnorme Calciumkonzentrationen können schwerwiegende physiologische Folgen nach sich ziehen. Erhöhte enddiastolische intrazelluläre Calciumkonzentrationen können Arrhythmien begünstigen. [Schaeffer, Rosenberg et al. 1999, #181]. Derartige Effekte gilt es bei der Ausarbeitung von Therapiestrategien zu berücksichtigen: so könnten erhöhte Calciumkonzentrationen bei *in vitro* Versuchen mit einer gesteigerten Kontraktilität einhergehen, *in vivo* hingegen unerwünschte Begleiterscheinungen wie Arrhythmien auftreten.

5.4 Ausblick

Die Wirkung von Agonisten und Antagonisten, die mit GPCR interagieren, wird durch Selektivitätsprofile bestimmt. Selektivität bezeichnet hierbei nicht nur eine bevorzugte Bindung und Wirkung an einer Rezeptorspezies, sondern auch die Stabilisierung spezifischer Rezeptorzustände. Funktionell selektive Wirkstoffe sind in der Lage einen Teil der für einen Rezeptor beschriebenen G-Proteine zu aktivieren [Seifert and Dove 2009, #182]. Durch Überexpression von RKIP konnte die Kontraktilität *in vitro* in NRCM und *in vivo* in Mäusen gesteigert werden. Eine Möglichkeit dies bei Patienten zu erreichen könnte eine Gentherapie sein, die durch Schmid *et al.* [Schmid 2016, #183] in Mäusen bereits erfolgreich war, eine Induktion der endogenen RKIP-Expression oder eine „positive“ Beeinflussung der RKIP-Funktion. Für die Entwicklung eines Therapeutikums sind Strategien interessant, die eine Phosphorylierung von RKIP begünstigen. Hierbei ist die Untersuchung weiterer Phosphorylierungsstellen wichtig. Auch die Identifikation weiterer Kinasen mit denen RKIP interagiert wird Forscher in Zukunft beschäftigen.

6 Zusammenfassung

Durch Phosphorylierung inaktiviert GRK2 kardiale β -AR und vermindert dadurch die Kontraktilität von NRCM. Als natürlicher Inhibitor der GRK2 beeinflusst RKIP die Signalweiterleitung bei Stimulation von β -AR. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von RKIP die Kontraktilität von NRCM erhöht. Es wurde die Anzahl auftretender Spontankontraktionen vor und nach Stimulation mit Isoproterenol erfasst sowie eine zeitliche Analyse der Calciumfreisetzung und -aufnahme nach elektrischer Stimulation durchgeführt. Im unstimulierten Zustand zeigten NRCM, die Wildtyp-RKIP überexprimierten, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich auftretender Spontankontraktionen. Nach Stimulation mit Isoproterenol zeigten NRCM, in denen Wildtyp-RKIP überexprimiert wurde, eine signifikant höhere Anzahl auftretender Spontankontraktionen. Eine Analyse der Calciumtransienten zeigte bei RKIP-Wildtyp überexprimierenden NRCM eine erhöhte Calciumfreisetzung während der Systole sowie eine beschleunigte Calciumwiederaufnahme während der Diastole. Diese Resultate decken sich mit den Schilderungen in der Publikation von E. Schmid zu adulten murinen Kardiomyozyten [Schmid 2016, #183]. Zudem wurden die RKIP-Mutanten RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} im Hinblick auf ihre Kontraktilität untersucht. NRCM, welche RKIP^{S51V} und RKIP^{S52V} überexprimierten zeigten weder im Hinblick auf auftretende Spontankontraktionen noch bei der Analyse der Calciumtransienten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (LacZ). Da auch eine Phosphorylierung an Aminosäureposition 51 bzw. Aminosäureposition 52 ohne direkte Auswirkung auf die Kontraktilität möglich ist, wurde in einem *in vitro* Kinase Assay analysiert, ob neben der bekannten Phosphorylierungsstelle S153 eine weitere Phosphorylierung von RKIP durch PKA oder PKC erfolgt. Bei Einsatz der an Aminosäureposition 153 phosphorylierungsdefizienten RKIP Mutante RKIP^{S153A} konnte keine Phosphorylierung beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte neben einer Phosphorylierung an S153 keine weitere Phosphorylierung von RKIP durch PKC oder PKA beobachtet werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (<i>engl. angiotensin converting enzyme</i>)
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaMK II	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>engl. cyclic adenosine monophosphate</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>engl. epidermal growth factor</i>)
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (<i>engl. guanine nucleotide exchange factor</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HZV	Herzeitvolumen
LTCC	L-Typ Calciumkanal (<i>engl. L-type calcium channel</i>)
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEM	Minimum essential medium
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher (<i>engl. Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
NRCM	neonatalen Rattenkardiomyozyten
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PH	Pleckstrin-Homologie (<i>engl. pleckstrin homology</i>)
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PLN	Phospholamban
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKIP	Raf Kinase Inhibitor Protein
RyR2	Ryanodinrezeptors 2

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>engl. standard error of the mean</i>)
SERCA	sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase
SOS	Son of Sevenless
SR	sarkoplasmatische Retikulum
β-AR	β-adrenerge Rezeptoren
SSRI	Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer (<i>engl. Serotonin Reuptake Inhibitor</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TnI	Troponin I
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. World Health Organization</i>)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Circulus vitiosus</i> der Herzinsuffizienz	4
Abbildung 2: Schema der G-Protein vermittelten Signaltransduktion	8
Abbildung 3: Einfluss der PKA auf Schlüsselproteine der kardialen Kontraktion	11
Abbildung 4: RKIP hemmt Raf1 oder GRK2 abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus.	15
Abbildung 5: Ruhe- und Kontraktionszustand	17
Abbildung 6: Schematischer Aufbau Aktinfilament	18
Abbildung 7: Querbrückenzyklus	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	29
Abbildung 9: Bestückung 96-Näpchen Platte	30
Abbildung 10: Konformationsänderung von Fura 2 bei Calciumbindung	40
Abbildung 11: Anregungs- und Emissionsspektren von Fura 2	41
Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Fluoreszenz	41
Abbildung 13: Lichtwege im Hyperswitch	43
Abbildung 14: Lichtwege bei der Calciumspiegelmessung	44
Abbildung 15: Schematische Darstellung Radioaktiv Kinase Assay	47
Abbildung 16: Immunoblot als Expressionsnachweis von RKIP in transduzierten NRCM	49
Abbildung 17: NRCM, die RKIP überexprimieren zeigen, nach Stimulation mit Isoproterenol gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte Schlagfrequenz	51
Abbildung 18: Mit RKIP transduzierte NRCM zeigen eine erhöhte Ca^{2+} Freisetzung und beschleunigte Ca^{2+} Wiederaufnahme	52
Abbildung 19: Primärsequenz RKIP <i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	53
Abbildung 20: Phosphorylierungsmotive von PKA und PKC	53
Abbildung 21: Neonatale Rattenkardiomyozyten, die RKIP überexprimieren, zeigen nach Stimulation mit Isoproterenol gegenüber der Kontrollgruppe sowie den RKIP Mutanten RKIP ^{SV51} und RKIP ^{SV52} eine erhöhte Schlagfrequenz.	54
Abbildung 22: Calciumtransientenmessungen an NRCM	55
Abbildung 23: Coomassie Färbung der RKIP ^{S153A} Mutante	57
Abbildung 24: Coomassie Färbung RKIP	57
Abbildung 25: Untersuchung der Phosphorylierung von RKIP durch PKA	59

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: G-Protein Familien und deren Effektorproteine	9
Tabelle 2: Liste der verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Liste der verwendeten Kits	24
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte	24
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien	25
Tabelle 6: Tabelle verwendeter primäre und sekundärer Antikörper	37
Tabelle 7: Anordnung der im <i>in vitro</i> kinase Assay eingesetzten Substanzen	58

7.4 Pufferzusammensetzungen

Auftragspuffer

Protease Inhibitor (PI)	1 % (m/v)
Phenylmethylsulfonylfluorid	1 % (v/v)
4 x Lämmli	25 % (v/v)

Lysispuffer

2 x TSE (4 °C)	50 % (v/v)
10 x IBX	10 % (v/v)
Triton X-100	1 % (v/v)

2x TSE (Tris/Saline/EDTA)

Tris-HCl, pH 7,4	100 mM
NaCl	600 mM
EDTA	10 mM
NaN ₃	0,02 % (m/v)

10X IBx

NaF	500 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
	0,02 %
NaN ₃	(m/v)

7.5 Literaturverzeichnis

- 1: Neumann, T., J. Biermann, R. Erbel, A. Neumann, J. Wasem, G. Ertl and R. Dietz (2009). "Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives." Dtsch Arztebl Int **106**(16): 269-275.
- 2: Townsend, N., M. Nichols, P. Scarborough and M. Rayner (2015). "Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015." European Heart Journal **36**(40): 2696.
- 3: Savarese, G. and L. H. Lund (2017). "Global Public Health Burden of Heart Failure." Card Fail Rev **3**(1): 7-11.
- 4: McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitzer, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad and A. Zeiher (2012). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur Heart J **33**(14): 1787-1847.
- 5: Dennis L. Kasper, A. S. F., Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo (2018). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Education Ltd; Auflage: 20. (13. August 2018). **20TH EDITION**: 1880 - 1882.
- 6: Strickman, N. E. (1987). "The pathogenesis and prognosis of end-stage heart disease." Tex Heart Inst J **14**(4): 346-350.
- 7: Cohn, J. N. (1973). "Vasodilator therapy for heart failure. The influence of impedance on left ventricular performance." Circulation **48**(1): 5-8.
- 8: Connelly, C. M., R. J. McLaughlin, W. M. Vogel and C. S. Apstein (1991). "Reversible and irreversible elongation of ischemic, infarcted, and healed myocardium in response to increases in preload and afterload." Circulation **84**(1): 387-399.
- 9: Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer and E. Braunwald (1985). "Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat." Circ Res **57**(1): 84-95.
- 10: Grossman, W., D. Jones and L. P. McLaurin (1975). "Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle." J Clin Invest **56**(1): 56-64.
- 11: Packer, M. (1992). "Pathophysiology of chronic heart failure." Lancet **340**(8811): 88-92.
- 12: Mudd, J. O. and D. A. Kass (2008). "Tackling heart failure in the twenty-first century." Nature **451**(7181): 919-928.
- 13: Mann, D. L. (1999). "Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach." Circulation **100**(9): 999-1008.
- 14: Armstrong, P. W. (2000). "Left ventricular dysfunction: causes, natural history, and hopes for reversal." Heart **84 Suppl 1**: i15-17:discussion i50.
- 15: Heusch, G., P. Libby, B. Gersh, D. Yellon, M. Bohm, G. Lopaschuk and L. Opie (2014). "Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure." Lancet **383**(9932): 1933-1943.
- 16: Hanft, L. M., F. S. Korte and K. S. McDonald (2008). "Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length." Cardiovasc Res **77**(4): 627-636.
- 17: Frank, O. (1959). "On the dynamics of cardiac muscle." American Heart Journal **58**(3): 467-478.
- 18: Patterson, S. W. and E. H. Starling (1914). "On the mechanical factors which determine the output of the ventricles." J Physiol **48**(5): 357-379.

- 19: Shchekochikhin, D., F. Al Ammary, J. A. Lindenfeld and R. Schrier (2013). "Role of diuretics and ultrafiltration in congestive heart failure." Pharmaceuticals (Basel) **6**(7): 851-866.
- 20: Schrier, R. W. (1990). "Body fluid volume regulation in health and disease: a unifying hypothesis." Ann Intern Med **113**(2): 155-159.
- 21: Mann, D. L., R. L. Kent, B. Parsons and G. t. Cooper (1992). "Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte." Circulation **85**(2): 790-804.
- 22: Fu, Y. C., C. S. Chi, S. C. Yin, B. Hwang, Y. T. Chiu and S. L. Hsu (2004). "Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF alpha-caspase signaling pathway." Cardiovasc Res **62**(3): 558-567.
- 23: Hasking, G. J., M. D. Esler, G. L. Jennings, D. Burton, J. A. Johns and P. I. Korner (1986). "Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity." Circulation **73**(4): 615-621.
- 24: Meredith, I. T., A. Broughton, G. L. Jennings and M. D. Esler (1991). "Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias." N Engl J Med **325**(9): 618-624.
- 25: Cohn, J. N., T. B. Levine, M. T. Olivari, V. Garberg, D. Lura, G. S. Francis, A. B. Simon and T. Rector (1984). "Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure." N Engl J Med **311**(13): 819-823.
- 26: Kaumann, A. J., J. A. Hall, K. J. Murray, F. C. Wells and M. J. Brown (1989). "A comparison of the effects of adrenaline and noradrenaline on human heart: the role of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the stimulation of adenylate cyclase and contractile force." Eur Heart J **10 Suppl B**: 29-37.
- 27: Ledoux, J., D. M. Gee and N. Leblanc (2003). "Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggests an alteration in vascular smooth muscle function." Br J Pharmacol **139**(7): 1245-1248.
- 28: Sibley, D. R. and R. J. Lefkowitz (1985). "Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model." Nature **317**(6033): 124-129.
- 29: Colucci, W. S., A. R. Denniss, G. F. Leatherman, R. J. Quigg, P. L. Ludmer, J. D. Marsh and D. F. Gauthier (1988). "Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. Dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition." Journal of Clinical Investigation **81**(4): 1103.
- 30: Eschenhagen, T. (2008). "Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die." Nat Med **14**(5): 485-487.
- 31: Dendorfer, A., A. Thornagel, W. Raasch, O. Grisk, K. Tempel and P. Dominiak (2002). "Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation." Hypertension **40**(3): 348-354.
- 32: Hofbauer, K. G., H. Zschiedrich and F. Gross (1976). "Regulation of renin release and intrarenal formation of angiotensin. Studies in the isolated perfused rat kidney." Clin Exp Pharmacol Physiol **3**(1): 73-93.
- 33: Laragh, J. H. and J. E. Sealey (1991). "Abnormal sodium metabolism and plasma renin activity (renal renin secretion) and the vasoconstriction volume hypothesis: implications for pathogenesis and treatment of hypertension and its vascular consequences (heart attack, stroke)." Clin Chem **37**(10 Pt 2): 1820-1827.
- 34: Brewster, U. C. and M. A. Perazella (2004). "The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease." Am J Med **116**(4): 263-272.
- 35: Skeggs, L. T., Jr., W. H. Marsh, J. R. Kahn and N. P. Shumway (1954). "The existence of two forms of hypertensin." J Exp Med **99**(3): 275-282.
- 36: Fountain JH, L. S. (2020, 27.07.2020). "Renin Angiotensin System." Retrieved 25.04.2019, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>.

- 37: Laragh, J. H., M. Angers, W. G. Kelly and S. Lieberman (1960). "Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man." Jama **174**: 234-240.
- 38: Anderson, J. V., A. D. Struthers, N. N. Payne, J. D. Slater and S. R. Bloom (1986). "Atrial natriuretic peptide inhibits the aldosterone response to angiotensin II in man." Clin Sci (Lond) **70**(5): 507-512.
- 39: Hunt, P. J., E. A. Espiner, M. G. Nicholls, A. M. Richards and T. G. Yandle (1996). "Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man." J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 3871-3876.
- 40: Ruskoaho, H. (2003). "Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure." Endocr Rev **24**(3): 341-356.
- 41: Waagstein, F., A. Hjalmarson, E. Varnauskas and I. Wallentin (1975). "Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy." Br Heart J **37**(10): 1022-1036.
- 42: Packer, M., M. R. Bristow, J. N. Cohn, W. S. Colucci, M. B. Fowler, E. M. Gilbert and N. H. Shusterman (1996). "The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group." N Engl J Med **334**(21): 1349-1355.
- 43: Bristow, M. R. (1984). "The adrenergic nervous system in heart failure." N Engl J Med **311**(13): 850-851.
- 44: Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.
- 45: Kolakowski, L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." Receptors Channels **2**(1): 1-7.
- 46: Bönisch, H., K. H. Graefe, J. M. Hahn and W. K. Lutz (2011). *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme: 79 - 81.
- 47: Brodde, O. E., S. Schuler, R. Kretsch, M. Brinkmann, H. G. Borst, R. Hetzer, J. C. Reidemeister, H. Warnecke and H. R. Zerkowski (1986). "Regional distribution of beta-adrenoceptors in the human heart: coexistence of functional beta 1- and beta 2-adrenoceptors in both atria and ventricles in severe congestive cardiomyopathy." J Cardiovasc Pharmacol **8**(6): 1235-1242.
- 48: Ghanouni, P., Z. Gryczynski, J. J. Steenhuis, T. W. Lee, D. L. Farrens, J. R. Lakowicz and B. K. Kobilka (2001). "Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor." J Biol Chem **276**(27): 24433-24436.
- 49: Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-649.
- 50: Hoffman, B. B. and R. J. Lefkowitz (1980). "Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 581-608.
- 51: Ahlquist, R. P. (1948). "A study of the adrenotropic receptors." Am J Physiol **153**(3): 586-600.
- 52: Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood and R. A. Dixon (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." Annu Rev Biochem **63**: 101-132.
- 53: Cassel, D. and Z. Selinger (1978). "Mechanism of adenylate cyclase activation through the beta-adrenergic receptor: catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(9): 4155-4159.
- 54: Spiegel, A. M. and L. S. Weinstein (2004). "Inherited diseases involving g proteins and g protein-coupled receptors." Annu Rev Med **55**: 27-39.
- 55: Adelstein, R. S. and E. Eisenberg (1980). "Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction." Annu Rev Biochem **49**: 921-956.

- 56: Katada, T., G. M. Bokoch, J. K. Northup, M. Ui and A. G. Gilman (1984). "The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein." J Biol Chem **259**(6): 3568-3577.
- 57: Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.
- 58: Simon, M. I., M. P. Strathmann and N. Gautam (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-808.
- 59: Pedersen, S. E. and E. M. Ross (1982). "Functional reconstitution of beta-adrenergic receptors and the stimulatory GTP-binding protein of adenylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7228-7232.
- 60: Stephens, L., A. Smrcka, F. T. Cooke, T. R. Jackson, P. C. Sternweis and P. T. Hawkins (1994). "A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits." Cell **77**(1): 83-93.
- 61: Matsui, T. and A. Rosenzweig (2005). "Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt." J Mol Cell Cardiol **38**(1): 63-71.
- 62: Rainer Deutzmann , R. N., Joachim Rassow (2012). Duale Reihe Biochemie Thieme, Thieme. **Auflage: 3 (21. März 2012):** Seite 564.
- 63: Karczewski, P., M. Kuschel, L. G. Baltas, S. Bartel and E. G. Krause (1997). "Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum." Basic Res Cardiol **92 Suppl 1**: 37-43.
- 64: Polakova, E., A. Illaste, E. Niggli and E. A. Sobie (2015). "Maximal acceleration of Ca²⁺ release refractoriness by beta-adrenergic stimulation requires dual activation of kinases PKA and CaMKII in mouse ventricular myocytes." J Physiol **593**(6): 1495-1507.
- 65: Layland, J., R. J. Solaro and A. M. Shah (2005). "Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation." Cardiovascular Research **66**(1): 12-21.
- 66: Gurevich, V. V. and E. V. Gurevich (2006). "The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors." Pharmacol Ther **110**(3): 465-502.
- 67: Huang, C. C. and J. J. Tesmer (2011). "Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs." J Biol Chem **286**(10): 7715-7721.
- 68: Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." Annu Rev Biochem **67**: 653-692.
- 69: Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-1550.
- 70: Daaka, Y., L. M. Luttrell, S. Ahn, G. J. Della Rocca, S. S. Ferguson, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1998). "Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(2): 685-688.
- 71: Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 289-319.
- 72: Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- 73: Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-450.

- 74: Wilden, U., E. Wust, I. Weyand and H. Kuhn (1986). "Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin." FEBS Lett **207**(2): 292-295.
- 75: Benovic, J. L., L. J. Pike, R. A. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1985). "Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein." J Biol Chem **260**(11): 7094-7101.
- 76: Roth, N. S., P. T. Campbell, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and M. J. Lohse (1991). "Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6201-6204.
- 77: Thompson, M. D., D. E. Cole and P. A. Jose (2008). "Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor signaling: insights from health and disease." Methods Mol Biol **448**: 77-107.
- 78: Krasel, C., M. Bunemann, K. Lorenz and M. J. Lohse (2005). "Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation." J Biol Chem **280**(10): 9528-9535.
- 79: Gurevich, V. V., S. B. Dion, J. J. Onorato, J. Ptasienski, C. M. Kim, R. Sterne-Marr, M. M. Hosey and J. L. Benovic (1995). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem **270**(2): 720-731.
- 80: Yu, S. S., R. J. Lefkowitz and W. P. Hausdorff (1993). "Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization." J Biol Chem **268**(1): 337-341.
- 81: Moore, C. A., S. K. Milano and J. L. Benovic (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-482.
- 82: Hanyaloglu, A. C. and M. von Zastrow (2008). "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 537-568.
- 83: Benovic, J. L., A. DeBlasi, W. C. Stone, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1989). "Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family." Science **246**(4927): 235-240.
- 84: Sibley, D. R., R. H. Strasser, J. L. Benovic, K. Daniel and R. J. Lefkowitz (1986). "Phosphorylation/dephosphorylation of the beta-adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(24): 9408-9412.
- 85: Premont, R. T., J. Inglese and R. J. Lefkowitz (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." Faseb j **9**(2): 175-182.
- 86: Lymperopoulos, A., G. Rengo and W. J. Koch (2012). "GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new." Curr Pharm Des **18**(2): 186-191.
- 87: Evron, T., T. L. Daigle and M. G. Caron (2012). "GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization." Trends Pharmacol Sci **33**(3): 154-164.
- 88: Ren, X. R., E. Reiter, S. Ahn, J. Kim, W. Chen and R. J. Lefkowitz (2005). "Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1448-1453.
- 89: Wang, Y., E. Gao, W. B. Lau, Y. Wang, G. Liu, J. J. Li, X. Wang, Y. Yuan, W. J. Koch and X. L. Ma (2015). "GRK2-Mediated Desensitization of AdipoR1 in Failing Heart." Circulation **131**(16): 1392-1404.
- 90: Ungerer, M., G. Parruti, M. Bohm, M. Puzicha, A. DeBlasi, E. Erdmann and M. J. Lohse (1994). "Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart." Circ Res **74**(2): 206-213.

- 91: Ungerer, M., K. Kessebohm, K. Kronsbein, M. J. Lohse and G. Richardt (1996). "Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia." Circ Res **79**(3): 455-460.
- 92: Raake, P. W., L. E. Vinge, E. Gao, M. Boucher, G. Rengo, X. Chen, B. R. DeGeorge, Jr., S. Matkovich, S. R. Houser, P. Most, A. D. Eckhart, G. W. Dorn, 2nd and W. J. Koch (2008). "G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure." Circ Res **103**(4): 413-422.
- 93: Dorn, G. W., 2nd (2009). "GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease." J Mol Med (Berl) **87**(5): 455-463.
- 94: Rockman, H. A., K. R. Chien, D. J. Choi, G. Iaccarino, J. J. Hunter, J. Ross, Jr., R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (1998). "Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7000-7005.
- 95: Harding, V. B., L. R. Jones, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch and H. A. Rockman (2001). "Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5809-5814.
- 96: Freeman, K., I. Lerman, E. G. Kranias, T. Bohlmeier, M. R. Bristow, R. J. Lefkowitz, G. Iaccarino, W. J. Koch and L. A. Leinwand (2001). "Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy." J Clin Invest **107**(8): 967-974.
- 97: Williams, M. L., J. A. Hata, J. Schroder, E. Rampersaud, J. Petrofski, A. Jakoi, C. A. Milano and W. J. Koch (2004). "Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts." Circulation **109**(13): 1590-1593.
- 98: Thal, D. M., K. T. Homan, J. Chen, E. K. Wu, P. M. Hinkle, Z. M. Huang, J. K. Chuprun, J. Song, E. Gao, J. Y. Cheung, L. A. Sklar, W. J. Koch and J. J. Tesmer (2012). "Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility." ACS Chem Biol **7**(11): 1830-1839.
- 99: Bernier, I. and P. Jolles (1984). "Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain." Biochim Biophys Acta **790**(2): 174-181.
- 100: Seddiqi, N., F. Bollengier, P. M. Alliel, J. P. Perin, F. Bonnet, S. Bucquoy, P. Jolles and F. Schoentgen (1994). "Amino acid sequence of the Homo sapiens brain 21-23-kDa protein (neuropolypeptide h3), comparison with its counterparts from Rattus norvegicus and Bos taurus species, and expression of its mRNA in different tissues." J Mol Evol **39**(6): 655-660.
- 101: Skinner, J. J. and M. R. Rosner (2014). "RKIP structure drives its function: a three-state model for regulation of RKIP." Crit Rev Oncog **19**(6): 483-488.
- 102: Banfield, M. J., J. J. Barker, A. C. Perry and R. L. Brady (1998). "Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction." Structure **6**(10): 1245-1254.
- 103: Yeung, K., T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy and W. Kolch (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." Nature **401**(6749): 173-177.
- 104: Zeng, L., A. Imamoto and M. R. Rosner (2008). "Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target." Expert Opin Ther Targets **12**(10): 1275-1287.
- 105: Yeung, K. C., D. W. Rose, A. S. Dhillon, D. Yaros, M. Gustafsson, D. Chatterjee, B. McFerran, J. Wyche, W. Kolch and J. M. Sedivy (2001). "Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation." Mol Cell Biol **21**(21): 7207-7217.
- 106: Lorenz, K., M. J. Lohse and U. Quitterer (2003). "Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2." Nature **426**(6966): 574-579.

- 107: Deiss, K., C. Kisker, M. J. Lohse and K. Lorenz (2012). "Raf kinase inhibitor protein (RKIP) dimer formation controls its target switch from Raf1 to G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2." J Biol Chem **287**(28): 23407-23417.
- 108: Mochly-Rosen, D., K. Das and K. V. Grimes (2012). "Protein kinase C, an elusive therapeutic target?" Nat Rev Drug Discov **11**(12): 937-957.
- 109: Okita, K., N. Matsukawa, M. Maki, H. Nakazawa, E. Katada, M. Hattori, H. Akatsu, C. V. Borlongan and K. Ojika (2009). "Analysis of DNA variations in promoter region of HCNP gene with Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 272-276.
- 110: Dangi-Garimella, S., J. Yun, E. M. Eves, M. Newman, S. J. Erkeland, S. M. Hammond, A. J. Minn and M. R. Rosner (2009). "Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7." Embo j **28**(4): 347-358.
- 111: Schmid, E., S. Neef, C. Berlin, A. Tomasovic, K. Kahlert, P. Nordbeck, K. Deiss, S. Denzinger, S. Herrmann, E. Wettwer, M. Weidendorfer, D. Becker, F. Schafer, N. Wagner, S. Ergun, J. P. Schmitt, H. A. Katus, F. Weidemann, U. Ravens, C. Maack, L. Hein, G. Ertl, O. J. Muller, L. S. Maier, M. J. Lohse and K. Lorenz (2015). "Cardiac RKIP induces a beneficial [beta]-adrenoceptor-dependent positive inotropy." Nat Med **21**(11): 1298-1306.
- 112: Zhao, J., V. B. O'Donnell, S. Balzar, C. M. St Croix, J. B. Trudeau and S. E. Wenzel (2011). "15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): 14246-14251.
- 113: Antico Arciuch, V. G., Y. Alippe, M. C. Carreras and J. J. Poderoso (2009). "Mitochondrial kinases in cell signaling: Facts and perspectives." Adv Drug Deliv Rev **61**(14): 1234-1249.
- 114: Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- 115: Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 827-837.
- 116: Van Aelst, L., M. Barr, S. Marcus, A. Polverino and M. Wigler (1993). "Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6213-6217.
- 117: Margolis, B. and E. Y. Skolnik (1994). "Activation of Ras by receptor tyrosine kinases." J Am Soc Nephrol **5**(6): 1288-1299.
- 118: Montagut, C. and J. Settleman (2009). "Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy." Cancer Lett **283**(2): 125-134.
- 119: Maurer, G., B. Tarkowski and M. Baccarini (2011). "Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities." Oncogene **30**(32): 3477-3488.
- 120: Niggli, E. and P. Lipp (1995). "Subcellular features of calcium signalling in heart muscle: what do we learn?" Cardiovasc Res **29**(4): 441-448.
- 121: Lüllmann-Rauch, R. (2009). Taschenlehrbuch Histologie (Deutsch) Broschiert – 12. August 2009, Thieme S. 217.
- 122: Sellers, J. R. and R. S. Adelstein (1987). "13 Regulation of Contractile Activity." The enzymes **18**: 381-418.
- 123: Herzberg, O. and M. N. James (1985). "Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 A resolution." Nature **313**(6004): 653-659.
- 124: Schmidt, R. F., F. Lang and M. Heckmann (2010). Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie, Springer. **31**: 104.

- 125: Carafoli, E. (1985). "The homeostasis of calcium in heart cells." J Mol Cell Cardiol **17**(3): 203-212.
- 126: Janczewski, A. M. and E. G. Lakatta (1993). "Buffering of calcium influx by sarcoplasmic reticulum during the action potential in guinea-pig ventricular myocytes." J Physiol **471**: 343-363.
- 127: Campbell, D. L., W. R. Giles, J. R. Hume and E. F. Shibata (1988). "Inactivation of calcium current in bull-frog atrial myocytes." J Physiol **403**: 287-315.
- 128: Hess, P. (1988). "Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review." Can J Physiol Pharmacol **66**(9): 1218-1223.
- 129: Goldhaber, J. I. and K. D. Philipson (2013). "Cardiac Sodium-Calcium Exchange and Efficient Excitation-Contraction Coupling: Implications for Heart Disease." Adv Exp Med Biol **961**: 355-364.
- 130: Caroni, P. and E. Carafoli (1980). "An ATP-dependent Ca²⁺-pumping system in dog heart sarcolemma." Nature **283**(5749): 765-767.
- 131: George J Siegel, M., Bernard W Agranoff, MD, R Wayne Albers, PhD, Stephen K Fisher, PhD, and Michael D Uhler, PhD. (1999). Basic Neurochemistry, 6th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- 132: Schatzmann, H. J. (1989). "The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum." Annu Rev Physiol **51**: 473-485.
- 133: Inui, M., A. Saito and S. Fleischer (1987). "Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures." J Biol Chem **262**(32): 15637-15642.
- 134: Kim, D. H., F. A. Sreter, S. T. Ohnishi, J. F. Ryan, J. Roberts, P. D. Allen, L. G. Meszaros, B. Antoniu and N. Ikemoto (1984). "Kinetic studies of Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of normal and malignant hyperthermia susceptible pig muscles." Biochim Biophys Acta **775**(3): 320-327.
- 135: Fabiato, A. (1983). "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum." Am J Physiol **245**(1): C1-14.
- 136: Barry, W. H. and J. H. Bridge (1993). "Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes." Circulation **87**(6): 1806-1815.
- 137: McDonald, T. F. (1982). "The slow inward calcium current in the heart." Annu Rev Physiol **44**: 425-434.
- 138: Bassani, J. W., W. Yuan and D. M. Bers (1995). "Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): C1313-1319.
- 139: Bers, D. M. and J. H. Bridge (1989). "Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity." Circ Res **65**(2): 334-342.
- 140: Kaur, G. and J. M. Dufour (2012). "Cell lines: Valuable tools or useless artifacts." Spermatogenesis **2**(1): 1-5.
- 141: Steinberg, M. S. (1963). "'ECM': its nature, origin and function in cell aggregation." Exp Cell Res **30**: 257-279.
- 142: Chlopcikova, S., J. Psotova and P. Miketova (2001). "Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **145**(2): 49-55.
- 143: Tennant, J. R. (1964). "EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY." Transplantation **2**: 685-694.
- 144: Mazia, D., G. Schatten and W. Sale (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.

- 145: Daber, R., S. Stayrook, A. Rosenberg and M. Lewis (2007). "Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors." *J Mol Biol* **370**(4): 609-619.
- 146: Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- 147: Werner A. Eckert, J. K. (1997). *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion*, Springer: 69.
- 148: Ogata, K., M. Arakawa, T. Kasahara, K. Shioiri-Nakano and K. Hiraoka (1983). "Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 75-82.
- 149: Naghavi M, W. H., Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, Vollset SE, Ozgoren AA, Abdalla S, Abd-Allah F, Abdel Aziz MI, Abera SF, Aboyans V, Abraham B, Abraham JP, Abuabara KE, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NM, Achoki T, Adelekan A, Ademi Z, Adofu K, Adou AK, Adsuar JC, Ärnlöv J, Agardh EE, Akena D, Al Khabouri MJ, Alasfoor D, Albittar M, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alfonso-Cristancho R, Alhabib S, Ali MK, Ali R, Alla F, Al Lami F, Allebeck P, AlMazroa MA, Al-Shahi Salman R, Alsharif U, Alvarez E, Alvarez-Guzman N, Amankwaa AA, Amare AT, Ameli O, Amini H, Ammar W, Anderson HR, Anderson BO, Antonio CA, Anwar P, Apfel H, Argeseanu Cunningham S, Arsic Arsenijevic VS, Artaman A, Asad MM, Asghar RJ, Assadi R, Atkins LS, Atkinson C, Badawi A, Bahit MC, Bakfalouni T, Balakrishnan K, Balalla S, Banerjee A, Barber RM, Barker-Collo SL, Barquera S, Barregard L, Barrero LH, Barrientos-Gutierrez T, Basu A, Basu S, Basulaiman MO, Beardsley J, Bedi N, Beghi E, Bekele T, Bell ML, Benjet C, Bennett DA, Bensenor IM, Benzian H, Bertozzi-Villa A, Beyene TJ, Bhala N, Bhalla A, Bhutta ZA, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Biryukov S, Blore JD, Blyth FM, Bohensky MA, Borges G, Bose D, Boufous S, Bourne RR, Boyers LN, Brainin M, Brauer M, Brayne CE, Brazinova A, Breitborde N, Brenner H, Briggs AD, Brown JC, Brugha TS, Buckle GC, Bui LN, Bukhman G, Burch M, Campos Nonato IR, Carabin H, Cárdenas R, Carapetis J, Carpenter DO, Caso V, Castañeda-Orjuela CA, Castro RE, Catalá-López F, Cavalleri F, Chang JC, Charlson FC, Che X, Chen H, Chen Y, Chen JS, Chen Z, Chiang PP, Chimed-Ochir O, Chowdhury R, Christensen H, Christophi CA, Chuang TW, Chugh SS, Cirillo M, Coates MM, Coffeng LE, Coggeshall MS, Cohen A, Colistro V, Colquhoun SM, Colomar M, Cooper LT, Cooper C, Coppola LM, Cortinovis M, Courville K, Cowie BC, Criqui MH, Crump JA, Cuevas-Nasu L, da Costa Leite I, Dabhadkar KC, Dandona L, Dandona R, Dansereau E, Dargan PI, Dayama A, De la Cruz-Góngora V, de la Vega SF, De Leo D, Degenhardt L, del Pozo-Cruz B, Dellavalle RP, Deribe K, Des Jarlais DC, Dessalegn M, deVeber GA, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Ortega JL, Diaz-Torne C, Dicker D, Ding EL, Dokova K, Dorsey ER, Driscoll TR, Duan L, Duber HC, Durrani AM, Ebel BE, Edmond KM, Ellenbogen RG, Elshrek Y, Ermakov SP, Erskine HE, Eshrati B, Esteghamati A, Estep K, Fürst T, Fahimi S, Fahrion AS, Faraon EJ, Farzadfar F, Fay DF, Feigl AB, Feigin VL, Felicio MM, Fereshtehnejad SM, Fernandes JG, Ferrari AJ, Fleming TD, Foigt N, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Paleo UF, Franklin RC, Futran ND, Gaffikin L, Gambashidze K, Gankpé FG, García-Guerra FA, Garcia AC, Geleijnse JM, Gessner BD, Gibney KB, Gillum RF, Gilmour S, Ginawi IA, Giroud M, Glaser EL, Goenka S, Gomez Dantes H, Gona P, Gonzalez-Medina D, Guinovart C, Gupta R, Gupta R, Gosselin RA, Gotay CC, Goto A, Gouda HN, Graetz N, Greenwell KF, Gughani HC, Gunnell D, Gutiérrez RA, Haagsma J, Hafezi-Nejad N, Hagan H, Hagstromer M, Halasa YA, Hamadeh RR, Hamavid H, Hammami M, Hancock J, Hankey GJ, Hansen GM, Harb HL, Harewood H, Haro JM, Havmoeller R, Hay RJ, Hay SI, Hedayati MT, Heredia Pi IB, Heuton KR, Heydarpour P, Higashi H, Hijar M, Hoek HW, Hoffman HJ, Hornberger JC, Hosgood HD, Hossain M, Hotez PJ, Hoy DG, Hsairi M, Hu G, Huang JJ, Huffman MD, Hughes AJ, Hussein A, Huynh C, Iannarone M, Iburg KM, Idrisov BT, Ikeda N, Innos K, Inoue M, Islami F, Ismayilova S, Jacobsen KH, Jassal S, Jayaraman SP, Jensen PN, Jha V, Jiang G, Jiang Y, Jonas JB, Joseph J, Juel K, Kabagambe EK, Kan H, Karch A, Karimkhani C, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kaul A, Kawakami N, Kazanjan K, Kazi DS, Kemp AH, Kengne AP, Keren A, Kereselidze M, Khader YS, Khalifa SE, Khan EA, Khan G, Khang YH, Kieling C, Kinfu Y, Kinge JM, Kim D, Kim S, Kivipelto M, Knibbs L, Knudsen AK, Kokubo Y, Kosen S, Kotagal M, Kravchenko MA, Krishnaswami S, Krueger H, Kuate Defo B, Kuipers EJ, Kucuk Bicer B, Kulkarni C, Kulkarni VS, Kumar K, Kumar RB, Kwan GF, Kyu H, Lai T, Lakshmana Balaji A, Lalloo R, Lallukka T, Lam H, Lan Q, Lansingh VC, Larson HJ, Larsson A, Lavados PM, Lawrynowicz AE, Leasher JL, Lee JT, Leigh J, Leinsalu M, Leung R, Levitz C, Li B, Li Y, Li Y, Liddell C, Lim SS, de Lima GM, Lind ML, Lipshultz SE, Liu S, Liu Y, Lloyd BK, Lofgren KT, Logroscino G, London SJ, Lortet-Tieulent J, Lotufo PA, Lucas RM, Lunevicius R, Lyons RA, Ma S, Machado VM, MacIntyre MF, Mackay MT, MacLachlan JH, Magis-Rodriguez C, Mahdi AA, Majdan M, Malekzadeh R, Mangalam S, Mapoma CC, Marape M, Marcenes W, Margono C, Marks GB, Marzan MB, Masci JR, Mashal MT, Masiye F, Mason-Jones AJ, Matzopolous R, Mayosi BM, Mazorodze TT, McGrath JJ, McKay AC, McKee M, McLain A, Meaney PA, Mehndiratta MM, Mejia-Rodriguez F, Melaku YA, Meltzer M, Memish ZA, Mendoza W, Mensah GA, Meretoja A, Mhimbira FA, Miller TR, Mills EJ, Misganaw A, Mishra SK, Mock CN,

Moffitt TE, Mohamed Ibrahim N, Mohammad KA, Mokdad AH, Mola GL, Monasta L, Monis Jde L, Montañez Hernandez JC, Montico M, Montine TJ, Mooney MD, Moore AR, Moradi-Lakeh M, Moran AE, Mori R, Moschandreas J, Moturi WN, Moyer ML, Mozaffarian D, Mueller UO, Mukaigawara M, Mullany EC, Murray J, Mustapha A, Naghavi P, Naheed A, Naidoo KS, Naldi L, Nand D, Nangia V, Narayan KM, Nash D, Nasher J, Nejari C, Nelson RG, Neuhouser M, Neupane SP, Newcomb PA, Newman L, Newton CR, Ng M, Ngalesoni FN, Nguyen G, Nguyen Nt, Nisar MI, Nolte S, Norheim OF, Norman RE, Norrving B, Nyakarahuka L, Odell S, O'Donnell M, Ohkubo T, Ohno SL, Olusanya BO, Omer SB, Opio JN, Orisakwe OE, Ortblad KF, Ortiz A, Otayza ML, Pain AW, Pandian JD, Panelo CI, Panniyammakal J, Papachristou C, Paternina Caicedo AJ, Patten SB, Patton GC, Paul VK, Pavlin B, Pearce N, Pellegrini CA, Pereira DM, Peresson SC, Perez-Padilla R, Perez-Ruiz FP, Perico N, Pervaiz A, Pesudovs K, Peterson CB, Petzold M, Phillips BK, Phillips DE, Phillips MR, Plass D, Piel FB, Poenaru D, Polinder S, Popova S, Poulton RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Qato D, Quezada AD, Quistberg DA, Rabito F, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman SU, Raju M, Rakovac I, Rana SM, Refaat A, Remuzzi G, Ribeiro AL, Ricci S, Riccio PM, Richardson L, Richardus JH, Roberts B, Roberts DA, Robinson M, Roca A, Rodriguez A, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Room R, Roth GA, Rothenbacher D, Rothstein DH, Rowley JT, Roy N, Ruhago GM, Rushton L, Sambandam S, Søreide K, Saeedi MY, Saha S, Sahathevan R, Sahraian MA, Sahle BW, Salomon JA, Salvo D, Samonte GM, Sampson U, Sanabria JR, Sandar L, Santos IS, Satpathy M, Sawhney M, Saylan M, Scarborough P, Schöttker B, Schmidt JC, Schneider IJ, Schumacher AE, Schwebel DC, Scott JG, Sepanlou SG, Servan-Mori EE, Shackelford K, Shaheen A, Shahraz S, Shakh-Nazarova M, Shangguan S, She J, Sheikhbahaei S, Shepard DS, Shibuya K, Shinohara Y, Shishani K, Shiue I, Shivakoti R, Shrimel MG, Sigfusdottir ID, Silberberg DH, Silva AP, Simard EP, Sindi S, Singh JA, Singh L, Sioson E, Skirbekk V, Sliwa K, So S, Soljak M, Soneji S, Soshnikov SS, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stanaway JD, Stathopoulou VK, Steenland K, Stein C, Steiner C, Stevens A, Stöckl H, Straif K, Stroumpoulis K, Sturua L, Sunguya BF, Swaminathan S, Swaroop M, Sykes BL, Tabb KM, Takahashi K, Talongwa RT, Tan F, Tanne D, Tanner M, Tavakkoli M, Ao BT, Teixeira CM, Templin T, Tenkorang EY, Terkawi AS, Thomas BA, Thorne-Lyman AL, Thrift AG, Thurston GD, Tillmann T, Tirschwell DL, Tleyjeh IM, Tonelli M, Topouzis F, Towbin JA, Toyoshima H, Traebert J, Tran BX, Truelsen T, Trujillo U, Trillini M, Tsala Dimbuene Z, Tsilimbaris M, Tuzcu EM, Ubeda C, Uchendu US, Ukwaja KN, Undurraga EA, Vallely AJ, van de Vijver S, van Gool CH, Varakin YY, Vasankari TJ, Vasconcelos AM, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Villalpando S, Violante FS, Vlassov VV, Wagner GR, Waller SG, Wang J, Wang L, Wang X, Wang Y, Warouw TS, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Wenzhi W, Werdecker A, Wessells KR, Westerman R, Whiteford HA, Wilkinson JD, Williams TN, Woldeyohannes SM, Wolfe CD, Wolock TM, Woolf AD, Wong JQ, Wright JL, Wulf S, Wurtz B, Xu G, Yang YC, Yano Y, Yatsuya H, Yip P, Yonemoto N, Yoon SJ, Younis M, Yu C, Yun Jin K, Zaki Mel S, Zamakhshary MF, Zeeb H, Zhang Y, Zhao Y, Zheng Y, Zhu J, Zhu S, Zonies D, Zou XN, Zunt JR, Vos T, Lopez AD, Murray CJ. (2015). "Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet* **385**(9963): 117-171.

150: Hastie, C. J., H. J. McLauchlan and P. Cohen (2006). "Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol." *Nat Protoc* **1**(2): 968-971.

151: Lorenz, K., M. R. Rosner, T. Brand and J. P. Schmitt (2017). "Raf kinase inhibitor protein: lessons of a better way for β -adrenergic receptor activation in the heart." *J Physiol* **595**(12): 4073-4087.

152: Engelhardt, S., L. Hein, F. Wiesmann and M. J. Lohse (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7059-7064.

153: Tacon, C. L., J. McCaffrey and A. Delaney (2012). "Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." *Intensive Care Med* **38**(3): 359-367.

154: Rockman, H. A., W. J. Koch and R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function." *Nature* **415**(6868): 206-212.

155: Deiß, K. (2012). Die Regulation des Kinasemodulators Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP): Einfluss von Phosphorylierung und Dimerisierung auf die Interaktion mit Raf1 und G Protein-gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2)

Regulation of the kinase modulator Raf kinase inhibitor protein (RKIP): Influence of phosphorylation and dimerization on its interaction with Raf1 and G protein coupled receptor kinase 2 (GRK2).

156: Colin Ong, L. M., Jonggul Kim, Suzana Gomes, Gianluigi Veglia, Marsha Rosner. (2014, 06.08.2014). "Molecular mechanism of Raf kinase inhibitory protein regulation by cAMP-dependent protein kinase (802.25)." Retrieved 10.05.2014, from http://www.fasebj.org/content/28/1_Supplement/802.25.

- 157: Amanchy, R., B. Periaswamy, S. Mathivanan, R. Reddy, S. G. Tattikota and A. Pandey (2007). "A curated compendium of phosphorylation motifs." Nat Biotechnol **25**(3): 285-286.
- 158: Pearce, L. R., D. Komander and D. R. Alessi (2010). "The nuts and bolts of AGC protein kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 9-22.
- 159: Dickson, C. (2008). "Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting." Methods Mol Biol **461**: 735-744.
- 160: Pagh-Roehl, K., D. Lin, L. Su and B. Burnside (1995). "Phosducin and PP33 are in vivo targets of PKA and type 1 or 2A phosphatases, regulators of cell elongation in teleost rod inner-outer segments." J Neurosci **15**(10): 6475-6488.
- 161: Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka (1982). "Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters." J Biol Chem **257**(13): 7847-7851.
- 162: Braconi Quintaje, S. and S. Orchard (2008). "The annotation of both human and mouse kinomes in UniProtKB/Swiss-Prot: one small step in manual annotation, one giant leap for full comprehension of genomes." Mol Cell Proteomics **7**(8): 1409-1419.
- 163: Krebs, E. G. (1998). "An accidental biochemist." Annu Rev Biochem **67**: xii-xxxii.
- 164: Clemens, M. J. (1996). Protein Phosphorylation in Cell Growth Regulation, Gordon and Breach (3. Dezember 1996).
- 165: Lemeer, S. and A. J. Heck (2009). "The phosphoproteomics data explosion." Curr Opin Chem Biol **13**(4): 414-420.
- 166: Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen and M. Mann (2006). "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." Cell **127**(3): 635-648.
- 167: Johnson, L. N. and D. Barford (1993). "The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 199-232.
- 168: Russo, A. A., P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich (1996). "Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation." Nat Struct Biol **3**(8): 696-700.
- 169: Hurley, J. H., A. M. Dean, P. E. Thorsness, D. E. Koshland, Jr. and R. M. Stroud (1990). "Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation involves no long-range conformational change in the free enzyme." J Biol Chem **265**(7): 3599-3602.
- 170: Welburn, J. P., J. A. Tucker, T. Johnson, L. Lindert, M. Morgan, A. Willis, M. E. Noble and J. A. Endicott (2007). "How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A." J Biol Chem **282**(5): 3173-3181.
- 171: Filippakopoulos, P., M. Kofler, O. Hantschel, G. D. Gish, F. Grebien, E. Salah, P. Neudecker, L. E. Kay, B. E. Turk, G. Superti-Furga, T. Pawson and S. Knapp (2008). "Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation." Cell **134**(5): 793-803.
- 172: Ferrarese, A., O. Marin, V. H. Bustos, A. Venerando, M. Antonelli, J. E. Allende and L. A. Pinna (2007). "Chemical dissection of the APC Repeat 3 multistep phosphorylation by the concerted action of protein kinases CK1 and GSK3." Biochemistry **46**(42): 11902-11910.
- 173: Gu, M., Z. Liu, R. Lai, S. Liu, W. Lin, C. Ouyang, S. Ye, H. Huang and X. Wang (2016). "RKIP and TBK1 form a positive feedback loop to promote type I interferon production in innate immunity." Embo j **35**(23): 2553-2565.
- 174: Shin, S. Y., O. Rath, S. M. Choo, F. Fee, B. McFerran, W. Kolch and K. H. Cho (2009). "Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway." J Cell Sci **122**(Pt 3): 425-435.

- 175: Granovsky, A. E., M. C. Clark, D. McElheny, G. Heil, J. Hong, X. Liu, Y. Kim, G. Joachimiak, A. Joachimiak, S. Koide and M. R. Rosner (2009). "Raf kinase inhibitory protein function is regulated via a flexible pocket and novel phosphorylation-dependent mechanism." Mol Cell Biol **29**(5): 1306-1320.
- 176: Pnueli, L., T. Gutfinger, D. Hareven, O. Ben-Naim, N. Ron, N. Adir and E. Lifschitz (2001). "Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering." Plant Cell **13**(12): 2687-2702.
- 177: Trakul, N. and M. R. Rosner (2005). "Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein." Cell Res **15**(1): 19-23.
- 178: Rath, O., S. Park, H. H. Tang, M. J. Banfield, R. L. Brady, Y. C. Lee, J. D. Dignam, J. M. Sedivy, W. Kolch and K. C. Yeung (2008). "The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK." Cell Signal **20**(5): 935-941.
- 179: Bah, A., R. M. Vernon, Z. Siddiqui, M. Krzeminski, R. Muhandiram, C. Zhao, N. Sonenberg, L. E. Kay and J. D. Forman-Kay (2015). "Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch." Nature **519**(7541): 106-109.
- 180: Gwathmey, J. K., L. Copelas, R. MacKinnon, F. J. Schoen, M. D. Feldman, W. Grossman and J. P. Morgan (1987). "Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure." Circ Res **61**(1): 70-76.
- 181: Schaeffer, L., M. Rosenberg, A. G. Bonz, C.-F. Vahl and S. Hagl (1999). "Kontraktionsverhalten und intrazelluläre Calciumtransienten bei ischämischer Kardiomyopathie: Der Einfluß der Vorlast, der Nachlast und der Frequenz." Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie **13**: 255-266.
- 182: Seifert, R. and S. Dove (2009). "Functional Selectivity of GPCR Ligand Stereoisomers: New Pharmacological Opportunities." Molecular Pharmacology **75**(1): 13.
- 183: Schmid, E. (2016). Effekte des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf β -adrenerge Signalwege, Herzfunktion und die Entwicklung der Herzinsuffizienz., Universität Würzburg, 2016, Dissertation. 124.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erzielen vorgelegt.

Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Datum

Unterschrift

8.2 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter bzw. ehemaligen Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie Würzburg, die mir in den vielen Stunden Freude und Kraft vermittelt haben und mich stets unterstützten. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Kristina Lorenz für die Vergabe des Dissertationsthemas, der umfassenden Betreuung und für die stetig schnelle und konstruktive Überarbeitung meiner Texte.

Ganz herzlich danke ich Dr. Evelyn Schmid für die vielen Ideen bei der Umsetzung der Experimente sowie Hilfestellungen bei Fragen aller Art und die vielseitigen Korrekturvorschläge. Vielen Dank an die technischen Assistentinnen Martina, Marianne und Karina für ihren täglichen engagierten Einsatz, ihr Fachwissen und ihre Geduld im Labor.

Auch bei meinen Mitdokoranten Tamara, Angela, Jonas, Thomas, Jürgen und Nenad möchte ich mich für die kollegiale und freundschaftliche Unterstützung sowie Herzlichkeit im Labor bedanken. Bei Theresa Brand und Johanna Teloh bedanke ich mich für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge der schriftlichen Arbeit.

Ebenfalls möchte ich Anastasia Berger für die Unterstützung und Geduld danken.

8.3 Curriculum vitae

PERSONALIEN

Name und Vorname: Florian Schäfer

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2007 / SS 2008	Studium der Mikrosystemtechnik (B. Sc.) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
WS 2008 / WS 2013	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
12.11.2013	Zahnärztliche Prüfung
02.12.2013	Approbation als Zahnarzt
01.01.2014 - 30.09.2014	Experimentelle Forschung am Institut für Pharmakologie und Toxikologie Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lorenz