

# **Substrate und Bedeutung der Protein-Phosphatase 5 im Säugetierherzen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Frau Franziska Werner**  
geb. am 13.08.1979 in Staßfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Fischer
2. Prof. Dr. med. habil. J. Neumann
3. Prof. Dr. med. habil. F. U. Müller

Halle, den 14.06.2010

**für meine Familie**

## Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	V
1	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung der reversiblen Proteinphosphorylierung	1
1.2	Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen	1
1.3	Protein-Phosphatase 5	3
1.4	Protein-Phosphatase 2C <sub>β</sub>	6
1.5	Regulation der Kontraktilität des Herzens	6
2	FRAGESTELLUNG	10
3	METHODEN	11
3.1	Arbeiten mit Bakterien	11
3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	11
3.1.2	Herstellung von Glycerinkulturen	11
3.1.3	Plasmid-DNA-Präparation	11
3.1.4	Transformation und Übernachtskultur	12
3.2	Arbeiten mit DNA	12
3.2.1	DNA-Isolierung aus Mausschwanzbiopsien	12
3.2.2	Restriktionsverdau von DNA	12
3.2.3	PCR	13
3.2.3.1	PCR zur Genotypisierung der PP5-transgenen Mauslinie	13
3.2.4	Herstellung einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde	13
3.2.5	Ligation	14
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	14
3.2.7	DNA-Extraktion aus Agarosegel	14
3.2.8	DNA-Sequenzierung	15
3.2.9	Aufreinigung endotoxinfreier DNA	15
3.3	Arbeiten mit RNA	15
3.3.1	RNA-Extraktion aus Herzgewebe	15
3.3.2	RNA-Gelelektrophorese	16
3.3.3	Transfer von RNA-Gelen auf Nylonmembranen	16
3.3.4	Northern-Hybridisierung	16
3.4	Arbeiten mit Proteinen	17
3.4.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	17
3.4.1.1	PP5	17
3.4.1.2	PP2C <sub>β</sub>	18
3.4.2	Herstellung von Homogenaten	18
3.4.3	Proteinbestimmungen	19
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Westernblot	19

3.4.5	Coomassie-Färbung	20
3.4.6	Immunologische Identifizierung von Proteinen und Phosphorylierungszuständen	20
3.4.7	2D-Gelelektrophorese	21
3.4.8	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten	21
3.4.8.1	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [ <sup>32</sup> P]-Casein	21
3.4.8.2	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber Substraten auf einer Peptidmembran	22
3.4.8.3	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [ <sup>32</sup> P]-PLB	23
3.4.8.4	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber Threonin17 phosphoryliertem PLB-Peptid	24
3.4.8.5	Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [ <sup>33</sup> P]-DARPP-32	24
3.4.9	Phosphorylierung von PP5 mit PKA	25
3.4.10	Rückphosphorylierung	25
3.5	Arbeiten mit Tieren	25
3.5.1	Tierlinien	26
3.5.2	Narkose und Herzpräparation	27
3.5.3	Applikation von Lipopolysaccharid (LPS)	27
3.5.4	Bestimmung von Interleukin-6-Konzentrationen	27
3.5.5	Messung kontraktile Parameter des Herzens an isolierten perfundierten Mäuseherzen	28
3.5.6	Präparation von Herzmuskelzellen aus adulten Mäuserherzen	29
3.5.7	Versuche mit isolierten Herzmuskelzellen	30
3.5.7.1	Markierung von Zellen mit [ <sup>32</sup> P]-Phosphorsäure	30
3.5.7.2	β-adrenerge Stimulierung von Zellen mit Isoprenalin	30
3.6	Menschliche Proben	31
3.7	Statistische Auswertung	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Expression rekombinanter Protein-Phosphatasen in <i>E. coli</i>	32
4.1.1	PP5	32
4.1.2	PP2C <sub>β</sub>	34
4.2	Klonierung der PP5-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor	35
4.3	Klonierung der PP2C <sub>β</sub> -cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor	36
4.3.1	PP2C <sub>β</sub> -Proteinexpression in verschiedenen Organen	38
4.4	Protein-Phosphatase-Aktivitäten	39
4.4.1	PP5	39
4.4.1.1	Dephosphorylierung von [ <sup>32</sup> P]-Casein	39
4.4.1.2	Dephosphorylierung membrangebundener Phosphopeptide	42
4.4.1.3	Dephosphorylierung Thr-phosphorylierter membrangebundener Peptide	46
4.4.1.4	Dephosphorylierung von Thr17-phosphoryliertem Phospholamban	47

4.4.1.5	Dephosphorylierung von [ <sup>32</sup> P]-Phospholamban	48
4.4.1.6	Dephosphorylierung von [ <sup>33</sup> P]-DARPP-32	50
4.4.2	PP2C <sub>β</sub>	52
4.4.2.1	Dephosphorylierung von [ <sup>32</sup> P]-Casein	52
4.4.2.2	Dephosphorylierung membrangebundener Phosphopeptide durch PP2C <sub>β</sub> im Vergleich zur PP5	54
4.4.3	Protein-Phosphatase-Aktivität in menschlichen Herzhomogenaten	56
4.4.3.1	Dephosphorylierung von [ <sup>32</sup> P]-Casein	56
4.5	Phosphorylierung von PP5 mit PKA	58
4.6	PP5-Proteinexpression in Herzen verschiedener Spezies	60
4.7	PP5-Proteinexpression im menschlichen Herzen	60
4.8	PP5-transgene Mäuse	62
4.8.1	Herzgewicht	62
4.8.2	PP5-mRNA-Expression in Herzen von Wildtyp- und PP5-transgenen Mäusen	63
4.8.3	PP5-Proteinexpression in Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen	63
4.8.4	Expression regulatorischer Proteine in Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen	64
4.8.5	Differentielle Proteinexpression	68
4.8.6	β-adrenerge Stimulierung isolierter Herzmuskelzellen	71
4.8.6.1	β-adrenerge Stimulierung [ <sup>32</sup> P]-markierter Herzmuskelzellen	71
4.8.6.2	β-adrenerge Stimulierung unmarkierter Zellen	73
4.8.7	Kontraktilität der Herzen von Wildtyp- und PP5-transgenen Mäusen – Vergleich von zwei transgenen Tierlinien	74
4.8.7.1	PP5-K20: Basalbedingungen	77
4.8.7.2	PP5-K20: β-adrenerge Stimulierung	78
4.8.7.3	PP5-K20: Vergleich zwischen Basalbedingungen und β-adrenerger Stimulierung	79
4.8.7.4	Phosphorylierung von PLB	80
4.8.7.5	PP5-K14: Basalbedingungen	83
4.8.7.6	PP5-K14: β-adrenerge Stimulierung	84
4.8.7.7	PP5-K14: Vergleich zwischen Basalbedingungen und β-adrenerger Stimulierung	85
4.9	Lipopolysaccharid-induzierte Sepsis	86
5	DISKUSSION	95
5.1	potentielle Substrate der PP5 im Herzen	95
5.2	potentielle Substrate der PP5 im Vergleich zu denen der PP2C <sub>β</sub>	99
5.3	Bedeutung der PP5 im Säugetierherz	99
5.4	Bedeutung der PP5 im Säugetierherz unter Belastung	102

6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	LITERATUR	106
8	ANHANG	120
8.1	Puffer und Lösungen	120
8.2	verwendete Restriktionsenzyme	127
8.3	PCR	127
8.4	PCR zur Genotypisierung der PP5-transgenen Mauslinie	128
8.5	Primer für Sequenzierungen	129
8.6	Ligations-Ansatz	129
8.7	Größenbereiche für Proteinnachweise im Westernblot	129
8.8	Übersicht der verwendeten Antikörper	129
8.9	Ansätze zum Versuch Phosphorylierung der PP5 durch PKA	130
8.10	Bezugsquellen	130
8.10.1	Substanzen	130
8.10.2	Antikörper	132
8.11	Peptide für Peptidmembran	133
8.12	Literatur Phosphopeptide	137

## Abkürzungen

<b>Abkürzung:</b>	<b>Bedeutung:</b>
AKAP	A-kinase anchoring protein /Proteinkinase A verankerndes Protein
$\alpha$ -MHC-Promotor	Promotor der $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia-Telangiectasia-mutierte Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM und Rad3 verwandte Kinase
B2AR	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor
BAD	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death / Bcl-2-Antagonist des Zelltodes
BCIP-T	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat, p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Calmodulinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat Adenosinmonophosphat
CD14	Cluster of differentiation (Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen) Rezeptor 14
CDC	cell division cycle / Zellteilungszyklus
CDK	Cyclin-dependent Kinase / Cyclin-abhängige Kinase
CICC	Dihydropyridin-sensitiver L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal, Skelettmuskel (A1S-Untereinheit)
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
CREB	cAMP responsives Element-Bindingsprotein
CREMt	cAMP-responsives Element Modulator
CREP	cAMP responsives Element-Bindingsprotein CREBP1
CSQ	Calsequestrin
DAG-Lipase	Diacylglycerol-Lipase
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein mit Molekulargewicht von 32 kDa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dehydrogenase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA-PKc	DNA-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinase
+dP/dt	Maximum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks
-dP/dt	Minimum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	enhanced/verstärkte Chemifluoreszenz

---

ECL	enhanced/verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrierkomplex III)
EF-2-Kinase	Elongationsfaktor 2 Kinase
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
evtl.	eventuell
FCP	Transkriptionsfaktor IIF assoziierte C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II dephosphorylierende Protein-Phosphatase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatografie
Glykogen PP1	Glykogen-bindende Untereinheit der Protein-Phosphatase 1
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hERG	Human Ether-A-Go-Go Related Gen / $K^+$ -Ionen-Transportkanal
HIF1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HRP	horseradish Peroxidase /Meerrettichperoxidase
Hsf-1	Hitzeschockfaktor 1
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
i.p.	intraperitoneal
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ID	Identifikationsnummer
IKK	Inhibitor of kappaB-Kinase
IL6	Interleukin-6
IP3R	Inositol 1,4,5-Triphosphat Typ I Rezeptor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISG15	Interferon-stimuliertes Gen 15
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kir2.1	Kir2.1 $K^+$ -Kanal
Kir2.3	Kir2.3 $K^+$ -Kanal
Kir6.2	Kir6.2-Untereinheit des ATP-abhängigen $K^+$ -Kanals ( $K_{ATP}$ )
Kv1.1 $_{\alpha}$	Kv1.1- $\alpha$ -Untereinheit des <i>Shaker</i> RCK1-spannungsregulierten $K^+$ -Kanals
Kv4.2 $_{\alpha}$	Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheit des <i>Shal</i> -Typ $K^+$ -Kanals
LA	linkes Atrium
LADP	Diastolischer Druck im linken Vorhof
LASP	Systolischer Druck im linken Vorhof
LPS	Lipopolysaccharid
LTCC	Spannungs-abhängiger L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal
LTCC- $\alpha$ 1	Spannungs-abhängiger L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal (Herz) $\alpha$ 1-Untereinheit
LTCC- $\beta$ 2a	Spannungs-abhängiger L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal (Herz) $\beta$ 2a-Untereinheit
LV	linker Ventrikel

---

LVDP	linksventrikulärer diastolischer Druck
LVP	linksventrikulärer Druck
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
MAG-Lipase	Monoacylglycerol-Lipase
MAK	male germ cell-associated protein kinase /männliche Keimzell-assozierte Proteinkinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MBC-C	Myosin-bindendes Protein C (Herzisoform)
MCS	Multiple Cloning Site
MD2	myeloides Differenzierungsprotein 2
MKK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase
MRK	MAK-verwandte Kinase
MSK1	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase 1
MyD88	myeloider Differentierungsfaktor 88
Na-K-H1 <sub>α</sub>	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase α1-Untereinheit
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz)	Spannungs-regulierter Na <sup>+</sup> -Kanal (Herztyp H1) α-Untereinheit
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NHE3	Na <sup>+</sup> H <sup>+</sup> -Austauscher 3
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
P	Phospho-
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE3B	cGMP-gehemmte Phosphodiesterase PDE3B
PDE4D3	cAMP-spezifische Phosphodiesterase PDE4D3
PDP	Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase
PI3Kγ	Phosphoinosid-3-Kinase γ
PKA	Proteinkinase A
PKA-RII <sub>α</sub>	cAMP-abhängige Proteinkinase regulatorische Untereinheit Typ II <sub>α</sub>
PKCε	Proteinkinase Cε
PKCδ	Proteinkinase Cδ
PKCζ	Proteinkinase Cζ
PLB	Phospholamban
PLC-β3	Phospholipase C- β3
PLC-γ1	Phospholipase C-γ1
PLM	Phospholemman
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Protein-Phosphatase/n
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PP2B	Protein-Phosphatase 2B
PP2C	Protein-Phosphatase 2C

---

PP4	Protein-Phosphatase 4
PP5	Protein-Phosphatase 5
PP6	Protein-Phosphatase 6
PP7	Protein-Phosphatase 7
PPM	Serin/Threonin-Protein-Phosphatase(n) mit $Mg^{2+}$ -abhängiger Aktivität
PPP	Serin/Threonin-Protein-Phosphatase(n) mit $Mg^{2+}$ -unabhängiger Aktivität
PPP1R9B	regulatorische (inhibitorische) Untereinheit 9B der PP1
PPT	homologe Protein-Phosphatase zur PP5 in <i>S. cerevisiae</i>
RA	rechtes Atrium
RV	rechter Ventrikel
RyR	Ryanodin-Rezeptor
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Ser16	Serin-16
Ser23	Serin-23
Ser24	Serin-24
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAK	TGF $\beta$ -aktivierte Kinase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TG	Maus mit herzspezifischer Überexpression der PP5
Thr	Threonin
Thr17	Threonin-17
TLR4	toll-like receptor 4
TnI	Troponin-Inhibitor
TPR	Tetratricopeptid-Wiederholungen
U	Unit(s) / Einheit(en)
usw.	und so weiter
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
vs.	versus
WT	Wildtyp-Maus

## 1. Einleitung

### 1.1. Bedeutung der reversiblen Proteinphosphorylierung

Die reversible Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen und -phosphatasen als wichtiger Mechanismus zur Veränderung der biologischen Aktivität vieler regulatorischer und Struktur-Proteine spielt eine zentrale Rolle bei vielen zellulären und metabolischen Prozessen, Protein-Protein-Interaktionen, Gen-Transkription, Zellzyklus und Apoptose. Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinen kann deren Funktion in vielfältiger Weise beeinflussen: die Aktivität erhöhen oder vermindern, ein Protein für den Abbau markieren, es von einem zu einem anderen subzellulären Kompartiment wandern lassen und eine Dissoziation von oder Assoziation mit anderen Proteinen erlauben. Etwa 30 % der menschlichen Proteine enthalten kovalent gebundenes Phosphat. Bei Eukaryoten findet Proteinphosphorylierung zu mehr als 98 % an Serin- und Threoninresten und zu 2 % an Tyrosin- und Histidinresten statt. Es wurden bisher ungefähr 400 Gene für Serin/Threonin-Proteinkinasen, aber nur ca. 30 Gene für Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen (katalytische Untereinheiten) gefunden, wobei Protein-Phosphatasen zahlreiche regulatorische Untereinheiten besitzen können (Cohen, 2001 und 2004, Honkanen und Golden, 2002).

### 1.2. Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen

Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen dephosphorylieren Phosphoserin und Phosphothreonin und können hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und ihrer katalytischen Untereinheiten in die drei strukturell verschiedenen Familien PPP (Prototyp PP1), PPM (Prototyp PP2C) und FCP (Prototyp Fcp1) eingeteilt werden (Cohen, 2004).

Die PPP-Familie bei Säugetieren kann in die Unterfamilien PPP1 (PP1), PPP2/4/6 (PP2A, PP4, PP6), PPP3 (PP2B), PPP5 (PP5) und PPP7 (PP7) eingeteilt werden, wobei Mitglieder der PPP1-Unterfamilie durch Inhibitor-1, Inhibitor-2 und relativ hohe Konzentrationen von Okadasäure ( $IC_{50}$ : 45 nM) gehemmt werden und vorzugsweise die  $\beta$ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase dephosphorylieren. Mitglieder der PPP2/4/6-Unterfamilie werden nicht durch Inhibitor-1 und Inhibitor-2 gehemmt und dephosphorylieren vorzugsweise die  $\alpha$ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase. Mitglieder der PPP3-Unterfamilie benötigen für eine Protein-Phosphatase-Aktivität  $Ca^{2+}$  und Calmodulin (Cohen, 2004, Herzig und Neumann, 2000). Das menschliche Genom enthält 13 Gene für Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen der PPP-Familie. Viele Vertreter der PPP-Familie sind hochmolekulare Komplexe mit einer oder mehreren regulatorischen Untereinheiten (Barford et al., 1998, Cohen, 2004).

PP7 und PP5 bestehen aus fusionierten amino- und carboxyterminalen Domänen, welche die katalytische Domäne um weitere Eigenschaften ergänzen. PP5 enthält eine inhibitorische und eine der Interaktion mit anderen Proteinen dienende aminoternale Domäne mit drei Tetratricopeptid-Wiederholungen-Motiven (TPR) (Cohen, 2004, Huang und Honkanen, 1998).

Die meisten Mitglieder der PP1c – PP6c-Untergruppen werden in allen Geweben exprimiert, dagegen ist die Expression von PP7c auf Retina und Gehirn begrenzt. Im Herzen werden alle Phosphatasen der PPP-Familie außer PP7c exprimiert (Bastians und Ponstingl, 1996, Brewis

et al., 1993, Chen et al., 1994, Huang und Honkanen, 1998, Kincaid et al., 1990, Lüss et al., 2000).

Einzelne Vertreter der PPPs zeigen eine unterschiedliche Hemmung der Protein-Phosphatase-Aktivität durch verschiedene Phosphatasehemmstoffe (Okadasäure, Fostriecin usw.), wodurch die Beteiligung verschiedener Phosphatasen an der Dephosphorylierung von Substraten in Zellen beurteilt werden kann. Aber oft werden verschiedene Phosphatasen bei der gleichen Konzentration eines Hemmstoffs gehemmt, z.B. hemmen 2 nM Okadasäure PP2A, PP4, PP5 und PP6 (Übersicht zu Hemmstoffen der Phosphatasen der PPP-Familie in Herzig und Neumann, 2000 und Honkanen und Golden, 2002). Der Komplex von PP2B und deren regulatorischen Untereinheiten wird durch die Immunsuppressiva Cyclosporin und FK506 gebunden und hat wichtige Bedeutungen bei Transplantationen (Cohen, 2004).

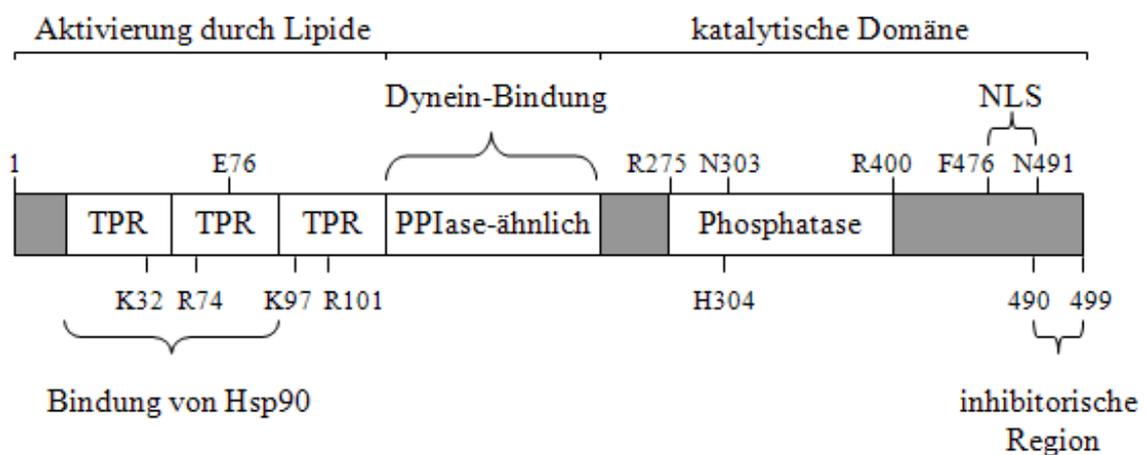
Das menschliche Genom enthält mindestens 10 Gene für Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen der PPM-Familie, die im Gegensatz zur PPP-Familie  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  für eine Protein-Phosphatase-Aktivität benötigen. Die Enzyme sind mit Ausnahme von PDP monomerisch. Vertreter der PP2C bei Säugetieren bestehen aus zwei Domänen: einer N-terminalen katalytischen Domäne und einer 90-Aminosäuren großen C-terminalen Domäne (Barford et al., 1998, Cohen, 2004).

Vertreter der PPM-Familie zeigen keine Sequenzähnlichkeit zur PPP-Familie, aber eine sehr ähnliche drei-dimensionale Struktur und einen sehr ähnlichen katalytischen Mechanismus.

Im Herz werden u.a. PP2C $_{\alpha}$  und PP2C $_{\beta}$  exprimiert (Lifschitz-Mercer et al., 2001, Marley et al., 1998).

### 1.3. Protein-Phosphatase 5

Protein-Phosphatase 5 (PP5) wurde 1994 von drei Forschergruppen unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben, besitzt ein scheinbares Molekulargewicht von 58 kDa, besteht aus 499 Aminosäuren und wurde u.a. bei *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae* (PPT1) und verschiedenen Säugetieren gefunden (Becker et al., 1994, Brown et al., 2000, Chen et al., 1994, Chinkers, 1994, Jeong et al., 2003). Das Gen für PP5 besteht aus 12 Exons und ist auf dem Chromosom 7 der Maus bzw. Chromosom 19 des Menschen lokalisiert (Chinkers, 1997, Xu et al., 1996). Der Aufbau des Proteins ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Schema zum Aufbau der Protein-Phosphatase 5 (TPR: Tetratricopeptid-Wiederholungen-Motiv, PPIase-ähnlich: Peptidyl-Prolyl-Isomerase-ähnliche Domäne, Phosphatase: katalytische Domäne, NLS: Kernlokalisierungssignal, aus Hinds und Sanchez, 2008).**

Im Gegensatz zu PP1 und PP2A sind bei PP5 alle Domänen in einer Peptidkette zusammengefasst. Die katalytische Domäne enthält für Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen typische Motive, ist aber nur entfernt verwandt mit PP1, PP2A und PP2B (38 - 42 % identische Aminosäuren). Die dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne (Reste 169 – 499) wurde von Swingle et al. (2004) untersucht. PP5 wird durch eine Mutation von Histidin 304 zu Alanin enzymatisch inaktiv (Becker et al., 1994, Borthwick et al., 2001, Swingle et al., 2004).

Aminoterminal befindet sich eine Domäne mit drei TPR-Motiven und einem TPR-ähnlichen Motiv. TPR-Motive sind degenerierte 34-Aminosäuren-Wiederholungen mit einigen konservierten Aminosäuren, die oft in Tandem-Arrays von 3 - 16 Motiven angeordnet sind. Sie dienen der Protein-Protein-Interaktion und bestehen aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, wodurch Tandem-Arrays der TPR-Motive eine rechtshändige Helixstruktur mit einem amphipathischen Kanal bilden. Die meisten TPR-enthaltenden Proteine sind in Multiproteinkomplexen assoziiert. TPR-Motive sind wichtig für die Funktion von Chaperonen, Zellzyklus, Transkription und Protein-Transport-Komplexen (Becker et al., 1994, Blatch und Lässle, 1999, D'Andrea und Regan, 2003, Das et al., 1998).

TPR-Motive bilden eine Gerüst-ähnliche Struktur, um Interaktionen mit anderen Proteinen oder TPR-Domänen zu ermöglichen. Bei der PP5 könnte diese Domäne das Enzym zum Substrat führen. Außerdem reguliert die TPR-Domäne die Aktivität der PP5. Die Protein-Phosphatase-Aktivität wird durch die TPR-Domäne gehemmt, indem diese das katalytische Zentrum blockiert. Dabei bindet die TPR-Domäne an die letzten 13 Reste des C-Terminus und hält so die Phosphatase in einem inaktiven Zustand. Die Entfernung der TPR-Domäne oder der letzten 13 C-terminalen Aminosäuren durch limitierte Proteolyse oder Deletions-Mutagenese erhöht die Protein-Phosphatase-Aktivität um ein Vielfaches (Sinclair et al., 1999). Durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Arachidonsäure), Lipidmoleküle mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Phosphatidylinositol) oder gesättigte langkettige Fettsäure-CoA-Ester kann die Protein-Phosphatase-Aktivität allosterisch 25fach gesteigert werden, wobei Phosphatidylinositol oder Arachidonsäure direkt an die TPR-Domäne binden (Chen & Cohen, 1997). Die Struktur der autoinhibierten PP5 und die Strukturveränderungen bei Zugabe von Hsp90 bzw. Arachidonsäure wurde von Yang et al., 2005 beschrieben. Hsp90 erhöht die Protein-Phosphatase-Aktivität etwa 10fach. Bindung von Fettsäuren an die TPR-Domäne führt zur Freilegung des aktiven Zentrums durch eine Bewegung der TPR-Domäne, wodurch Substrate zum aktiven Zentrum gelangen (Beaufils et al., 2008, Chen und Cohen, 1997, Kang et al., 2001, Ramsey und Chinkers, 2002, Sinclair et al., 1999, Yang et al., 2005).

Es ist nicht geklärt, ob Fettsäuren oder bis jetzt unbekannte Faktoren die wirklichen physiologischen Aktivatoren der PP5 sind. Es könnten auch andere Moleküle oder die spezifische subzelluläre Lokalisierung eine Rolle in der Aktivierung der PP5 durch Fettsäuren spielen (Fukuda et al., 2007, Skinner et al., 1997).

Silverstein et al. (1997) fanden eine 55-Aminosäuren-lange verbindende Region zwischen der N-terminalen TPR-Domäne und der C-terminalen Phosphatase-Domäne, die eine 50%ige Aminosäuren-Homologie und 22%ige Identität mit dem zentralen Teil der Peptidylprolyl-Isomerase-Domäne von FKBP52 besitzt (PPIase-ähnliche Domäne). Die PPIase-Aktivität dieser Domäne ist umstritten (Silverstein et al., 1997, Wandinger et al., 2006).

Einige Gruppen beschreiben die Lokalisation der PP5 im Zellkern und weniger im Zytosol, es wird vermutet, daß diese Phosphatase eine Rolle in RNA-Biogenese spielt (Chen et al., 1994).

Es wird aber auch eine bevorzugte Lokalisation im Zytosol beschrieben. Allerdings sind die C-terminalen Aminosäuren 420 - 499 mit der Konsensus-Sequenz FXAVPHPXΦXPMAYAN essentiell für die Lokalisation im Kern (Borthwick et al., 2001, Brown et al., 2000, Jeong et al., 2003). PP5 könnte eine Rolle bei der Bildung der Kernmembran spielen (Fukuda et al., 2007). Eine Lokalisation der PP5 an/in Membranen wird diskutiert (Chen und Cohen, 1997). PP5 wird ubiquitär mit teilweise hohen Expressionsspiegeln im Gehirn exprimiert (Bahl et al., 2001, Becker et al., 1994).

PP5 ist weitgehend unempfindlich gegenüber Fostriecin ( $IC_{50}$ , 700  $\mu$ M), wird aber stark gehemmt durch Okadasäure ( $IC_{50}$ , 7 nM), Microcystin ( $IC_{50}$ , 2,5 nM), Calyculin A ( $IC_{50}$ , 100 nM), Tautomycin ( $IC_{50}$ , 120 nM), Cantharidin ( $IC_{50}$ , 50 nM) und Spermin. PP5 ist im Vergleich zu anderen Phosphatasen der PPP-Familie am empfindlichsten gegenüber Fumonisin B1 ( $IC_{50}$ : 80  $\mu$ M) (Borthwick et al., 2001, Fukuda et al., 1996, Kutuzov et al., 2005).

PP5 interagiert mit zahlreichen Proteinen bzw. Proteinkomplexen, dazu gehören: die Proteinkinasedomäne des ANP/Guanylatcyclase-Rezeptors, Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexe bzw. Glucocorticoid-Rezeptor-Hsp90-Komplexe, Mineralocorticoid-Rezeptoren, A- und B-Untereinheiten der PP2A, CDC16/CDC27-Untereinheiten des Anaphase-Promoting Komplexes, Cryptochrom-2, Hsp90-abhängige Häm-regulierte eIF2 $\alpha$ -Kinase, ASK1, DNA-PKc, ATM, ATR, G $_{\alpha 12}$ -/G $_{\alpha 13}$ -Untereinheiten aktivierter heterotrimerischer G-Proteine, Rac, Raf1, MRK, G5PR, Chp1, p53, Hsp90 (EEVD-Motiv des C-Terminus), Hsp70, Dynein, Copinen, Östrogen-Rezeptoren und Hsf-1-Hsp90-Komplexe (Chen et al., 1996, Fu et al., 2006, Galigniana et al., 2002 und 2004, Gallo et al., 2007, Golden et al., 2008b, Hahn, 2005, Kono et al., 2002, Liu und Khawaja, 2005, Tomsig et al., 2003, Zeke et al., 2005). Es wird eine Assoziation der PP5 mit Androgen-Rezeptoren angenommen (Periysamy et al., 2007). In vielen Fällen stellt der Bindungspartner der PP5 kein Substrat dar, sondern eher einen Partner in einem Proteinkomplex, der auch ein bzw. mehrere Substrate enthält (Golden et al., 2008b). Substrate rekombinanter PP5 in vitro sind Histon H1, Myelin basisches Protein und Casein, wobei die Protein-Phosphatase-Aktivität geringer ist als bei PP1 oder PP2A (Skinner et al., 1997). PP5 dephosphoryliert tau (Gong et al., 2004), MRK (Thr157, Fu et al., 2006), p53 (Ser15, Urban et al., 2003), Raf-1 (Ser-338, von Kriegsheim et al., 2006) und Chaperon-Protein CDC37 (Ser13, Vaughan et al., 2008). PP5 scheint an der Dephosphorylierung von Ser118 der Östrogen-Rezeptoren beteiligt zu sein (Ikeda et al., 2005). PP5 ist an der Dephosphorylierung des GR beteiligt (Wang et al., 2007). Die homologe Protein-Phosphatase der PP5 in *Saccharomyces cerevisiae* PPT1 kann Hsp90 dephosphorylieren (Wandinger et al., 2006).

Eine Interaktion von G $_{\alpha 12}$ -/G $_{\alpha 13}$ -Untereinheiten aktivierter heterotrimerischer G-Proteine mit PP5 bewirkt deren Translokation vom Zytosol zur Zellmembran und eine Aktivierung der PP5 (Yamaguchi et al., 2002). Bei längerer Hypoxie ist die Expression der PP5 – über eine Aktivierung des Transkriptionsaktivators HIF1 – erhöht (Zhou et al., 2004). PP5 hemmt über eine Dephosphorylierung von Östrogen-Rezeptoren die Transkriptionsaktivität dieser Rezeptoren (Ikeda et al., 2005). Auch hemmt sie die DNA-Bindungsaktivität und Transkriptionsaktivität von Hsf-1 (Conde et al., 2005). Eine Aktivierung von ASK1 führt zur schnellen Dissoziation der PP2A-B''-regulatorischen Untereinheit (PR72) vom PP5-ASK1-Komplex und senkt die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 (Huang et al., 2004). Bei einer Behandlung von Zellen mit Arachidonsäure bzw. mit Nocadazol dissoziiert PP5 von Hsp90/70 und erhöht die Aktivität der Phosphatase. Das Kernlokalisationsignal wird abgespalten und die PP5 kann ins Zytosol wandern. PP5 vermittelt eine Dephosphorylierung von FKBP52 (Zhao et al., 2006). Bei akuter Gabe physiologischer Aldosteronkonzentrationen an Mäusen, denen vorher die Nebennieren entnommen wurden, sinkt im Herzen in den ersten drei Stunden die PP5-Expression (mRNA) und normalisiert sich wieder nach 5 Stunden (Turchin et al., 2006).

Im Gegensatz zu Knockouts anderer Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen überleben Mäuse mit einem Knockout der PP5 die Embryonalentwicklung, zeigen allerdings einen Defekt im durch ionisierende Strahlung induzierten G $_2$ /M-DNA-Schaden-Checkpoint, was durch eine verminderte Aktivität der ATM-Kinase und eine verminderte Phosphorylierung von Rad17 an

Serin-645/Serin-635 und von Chk2 an Threonin-68 erklärt werden kann (Brown et al., 2000, Sasaki et al., 2007, Yong et al., 2007).

Bei verschiedenen Tumoren ist die Expression der PP5 auf Proteinebene erhöht (Golden et al., 2008a, Periyasamy et al., 2007, Shirato et al., 2000).

#### 1.4. Protein-Phosphatase 2C $\beta$

Es gibt mindestens 5 verschiedene Isoformen der Protein-Phosphatase 2C $\beta$  (PP2C $\beta$ ), die sich nur im C-terminalen Bereich unterscheiden und durch alternatives Spleißen entstehen. Das PP2C $\beta$ -Gen besteht aus 8 Exons, wobei die Transkripte des Exon 1 ubiquitär, des Exon 2 v.a. in Hoden, im Darm und in der Leber exprimiert werden. Die Expression ist gewebs- und entwicklungsspezifisch. Die PP2C $\beta$  enthält mindestens zwei verschiedene funktionelle Domänen (N-terminale katalytische Domäne und Substratspezifität bestimmende C-terminale Domäne). Die Isoformen zeigen unterschiedliche Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [ $^{32}$ P]-Phospho-Histon, aber nicht gegenüber [ $^{32}$ P]-Phospho-Casein. Die Aktivität der PP2C $\beta$  kann durch Mg $^{2+}$  in Kombination mit einfach bzw. mehrfach ungesättigten Fettsäuren stimuliert werden (Klumpp et al., 1998, Marley et al., 1998, Ohnishi et al., 1999).

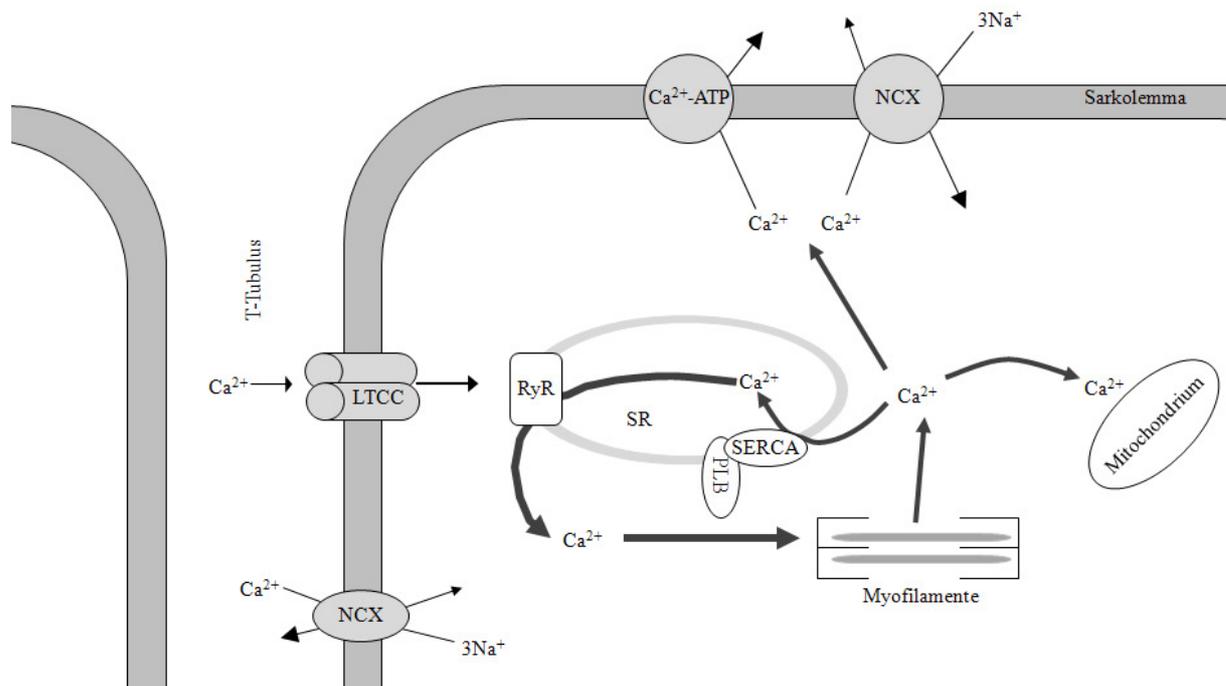
PP2C $\beta$  kann mit dem I $\kappa$ B-Kinasen-Komplex assoziieren, was zur Dephosphorylierung und reduzierten Kinaseaktivität der I $\kappa$ B-Kinase  $\beta$  sowie zur reduzierten Aktivität von NF- $\kappa$ B führt. Dadurch wird die Immun- und Entzündungsantwort gehemmt. PP2C $\beta$  fördert Apoptose durch Kolokalisierung und Dephosphorylierung von Bad, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl2-Familie. Unter bestimmten Bedingungen unterdrückt PP2C $\beta$  Phosphorylierung von Kinasen des Stress-aktivierten Kinase-Signalwegs. PP2C $\beta$  kann durch Dephosphorylierung der Zyklin-abhängigen Kinase 2 an Position 160 das Fortschreiten des Zellzyklus hemmen und durch Dephosphorylierung von Phosphomoesin aus Blutplättchen die Plättchenaggregation hemmen (Hanada et al., 1998 und 2001, Hishiya et al., 1999, Hufnagel et al., 2005, Kaldis et al., 2000, Prajapati et al., 2004).

Ein Knockout der PP2C $\beta$  ist embryonal letal, damit scheint diese Phosphatase eine Rolle in der Embryonalentwicklung zu spielen (Sasaki et al., 2007).

#### 1.5. Regulation der Kontraktilität des Herzens

**Basalbedingungen:** Nach der Depolarisation der Herzmuskelzellmembran steigt die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration durch den spannungsabhängigen L-Typ-Ca $^{2+}$ -Kanal, der Ca $^{2+}$  in das Zytosol strömen läßt. Die L-Typ-Ca $^{2+}$ -Kanäle sind in den transversen Tubuli (T-Tubuli) und in der Nähe des sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisiert, werden durch Proteinkinasen und Protein-Phosphatasen in ihrer Aktivität reguliert. Dieser Ca $^{2+}$ -Einstrom löst eine Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR durch Ca $^{2+}$ -Freisetzungskanäle oder Ryanodin-Rezeptoren (RyR) aus (Ca $^{2+}$ -induzierte Ca $^{2+}$ -Freisetzung). In geringem Ausmaße kann Ca $^{2+}$  auch über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX, Sarkolemma) in die Zelle eintreten. Durch diese Prozesse steigt die zytosolische Ca $^{2+}$ -Konzentration, Ca $^{2+}$  diffundiert zu den Myofilamenten, bindet an Troponin C und initiiert so die Kontraktion. Für die Relaxation wird Ca $^{2+}$  hauptsächlich durch die SR Ca $^{2+}$ -ATPase SERCA und durch NCX, aber auch durch die Ca $^{2+}$ -ATPase des Sarkolemmas und den mitochondrialen Ca $^{2+}$ -Uniporter, aus dem Zytoplasma entfernt, wodurch Ca $^{2+}$  von Troponin dissoziiert. Gleichzeitig wird der Ca $^{2+}$ -

Ausstrom aus dem SR durch Inaktivierung des RyR gehemmt. Im SR bindet  $\text{Ca}^{2+}$  hauptsächlich an Calsequestrin (CSQ) und an das Histidin-reiche Protein. CSQ ist über die Proteine Junctin und Triadin mit dem RyR assoziiert, somit ist eine schnellere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR während der frühen Systole möglich. Für die Aktivität von SERCA ist das Verhältnis der Proteinexpression von SERCA und Phospholamban (PLB) wie auch der Phosphorylierungszustand von PLB entscheidend (Bers, 2002, Bodi et al., 2005, duBell und Rogers, 2004, MacLennan und Kranias, 2003, Suk et al., 1999, Zhang et al., 1997). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zyklus ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

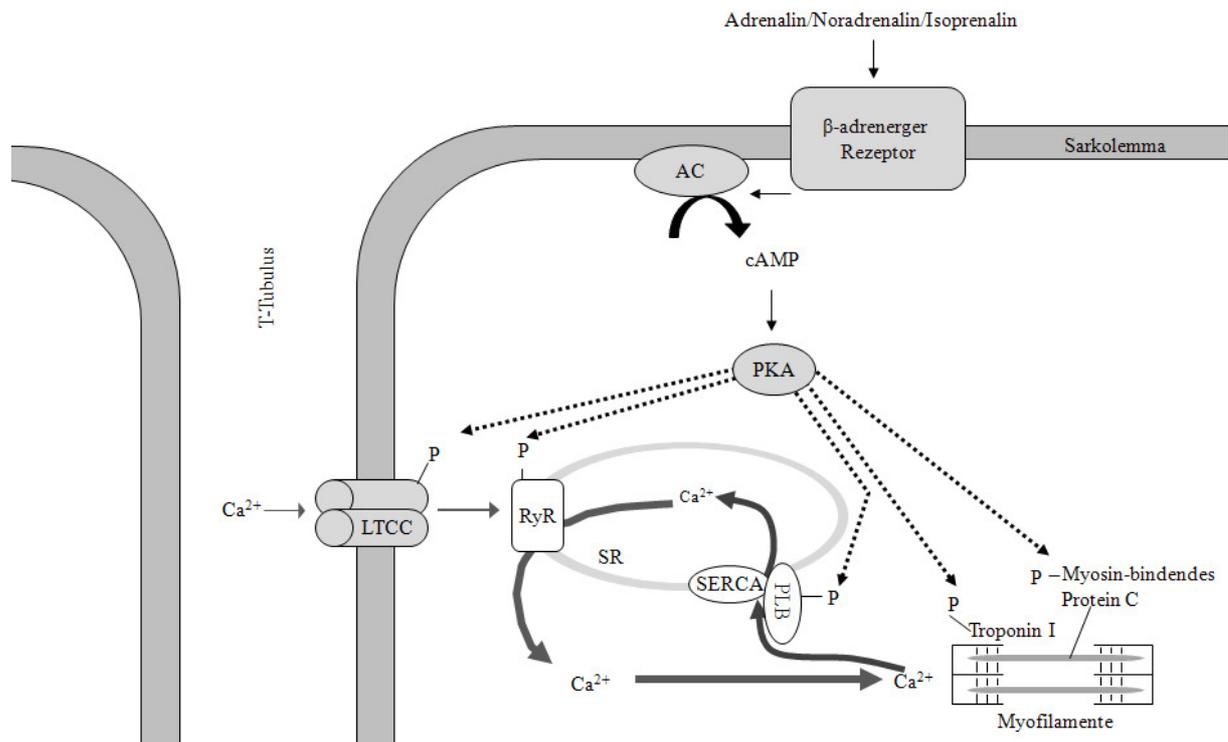


**Abbildung 2:  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in ventrikulären Herzmuskelzellen und beteiligte Proteine:** Nach Depolarisation der Herzmuskelzellmembran wird  $\text{Ca}^{2+}$  vermehrt durch den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC) ins Zytosol transportiert. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom löst eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) aus. In geringem Maß tritt  $\text{Ca}^{2+}$  auch durch den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) in die Zelle ein.  $\text{Ca}^{2+}$  diffundiert zu den Myofilamenten, bindet an Troponin C und initiiert die Kontraktion. Bei der Relaxation wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), durch NCX, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Sarkolemmas ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) und durch mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter aus dem Zytosol entfernt.  $\text{Ca}^{2+}$  dissoziiert von Troponin C und fördert damit die Relaxation. Für die Aktivität von SERCA ist Phospholamban (PLB) wichtig (nach Bers, 2002, Bodi et al., 2005).

**$\beta$ -adrenerge Stimulierung:** Stimulierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, z. B. durch Isoprenalin oder endogene Katecholamine, aktiviert ein G-Protein ( $G_s$ ), welches die Adenylylcyclase stimuliert, zur Bildung von cAMP und infolgedessen zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. PKA phosphoryliert u. a. PLB, den L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal, RyR, Troponin-Inhibitor, Inhibitor-1 und Myosin-bindendes Protein C. Durch die erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird auch die Calmodulin-Kinase II (CaMKII) aktiviert. Die Aktivierung der Proteinkinasen führt zu einer Phosphorylierung von PLB an Serin-16 durch PKA und Threonin-17 durch CaMKII. PLB besteht aus 52 Aminosäuren, ist als Monomer etwa 6,1 kDa groß und bildet *in vivo* Pentamere aus 5 identischen Untereinheiten. Im unphosphorylierten Zustand bindet und hemmt PLB die SERCA. Beide Phosphorylierungen erhöhen die Affinität der  $Ca^{2+}$ -ATPase SERCA für  $Ca^{2+}$ , somit wird mehr  $Ca^{2+}$  in das SR gepumpt und es kommt zu einer Akkumulation von  $Ca^{2+}$  im SR. Damit wird die Relaxation beschleunigt (positiv lusitroper Effekt) und es steht mehr  $Ca^{2+}$  für die Freisetzung zur Verfügung, was letztendlich die Kontraktilität erhöht (positiv inotroper Effekt) (Bers, 2002, Brittsan und Kranias, 2000, Gao et al., 1997, Jones et al., 1985, Kuschel et al., 1999, Simmerman und Jones, 1998, Xiao et al., 2006).

Die durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulierung hervorgerufenen Phosphorylierungen werden durch Protein-Phosphatasen gegenreguliert und bewirken so die Rückkehr der Kontraktilität zu Basalwerten. PLB kann an Serin-16 und Threonin-17 durch PP1, PP2A und PP2C dephosphoryliert werden, wodurch die Hemmung von SERCA durch PLB wieder hergestellt werden kann. Der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal kann durch PP2A dephosphoryliert und in seiner Aktivität reguliert werden. Die PP1 ist an der Regulation der Antwort auf  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten beteiligt. Sie wird durch den von PKA an Thr-35 phosphorylierten Inhibitor-1 gehemmt. Die Antwort auf  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten wird verstärkt. An Threonin-35 phosphorylierter Inhibitor-1 kann durch PP2A und PP2B dephosphoryliert und inaktiviert werden (El-Armouche et al., 2006, Gupta et al., 2002, Hall et al., 2006, MacDougall et al., 1991, Neumann et al., 1991).

Ein weiterer Mechanismus zur Modulierung der Kontraktilität ist die Phosphorylierung von Troponin-Inhibitor (Ser23 und Ser24) durch PKA. Durch diese Phosphorylierung sinkt die Affinität von Troponin C für  $Ca^{2+}$ , die Myofilamente werden gegenüber  $Ca^{2+}$  desensitiviert und die Relaxation wird beschleunigt (Bers, 2002). Abbildung 3 gibt einen schematischen Überblick über  $\beta$ -adrenerge Effekte an der Herzmuskelzelle.



**Abbildung 3: Auswirkungen einer  $\beta$ -adrenergen Aktivierung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase einer Herzmuskelzelle: Stimulierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren aktiviert über ein G-Protein die Adenylcyclase (AC), welche zur Bildung von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) angeregt wird. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA). PKA phosphoryliert (P) eine Reihe von Proteinen, wie Phospholamban (PLB), die sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), den Ryanodin-Rezeptor (RyR) und den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC). PLB, SERCA und RyR sind in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisiert (nach Bers, 2002, MacLennan und Kranias, 2003).**

**pathologische Bedingungen:** Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise bei Hypertrophie, Dilatation oder Kardiomyopathien, können viele Proteine in ihrer Expression, Aktivität oder in ihrem Phosphorylierungszustand verändert sein und es gibt experimentelle Nachweise, daß zahlreiche Proteine bei Überexpression, Knockout oder Mutation zu einer Kardiomyopathie führen. Beispiele sind spannungs-abhängiger L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, Inhibitor-1, Myosin-bindendes Protein C, Protein-Phosphatase 1, Protein-Phosphatase 2A, PLB und Troponin-Inhibitor. Bei einer Herzinsuffizienz ist die Anzahl der  $\beta$ -Adrenozeptoren herabgesetzt. Dadurch ist die Phosphorylierung von PLB vermindert und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR reduziert (Bilchick et al., 2007, Bodi et al., 2005, El-Armouche et al., 2004 und 2007, Gergs et al., 2004a, MacLennan und Kranias, 2003, Neumann et al., 1997).

## 2. Fragestellung

PP5 ist eine ubiquitär exprimierte und in ihrer Sequenz hochgradig konservierte Protein-Phosphatase, deren katalytische Domäne in ihrer Struktur mit PP1, PP2A und PP2B verwandt ist, aber nur eine etwa 40%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit diesen Phosphatasen zeigt. Im Gegensatz zu diesen Phosphatasen sind bei PP5 katalytische und regulatorische Funktionen in einem Polypeptid vereint. Die TPR-Domäne ermöglicht Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen, wie beispielsweise des ANP-Rezeptors im Herzen. Zugleich führt die Hemmung der Protein-Phosphatase-Aktivität durch die TPR-Domäne (Autoinhibition) zu einer niedrigen basalen Protein-Phosphatase-Aktivität, weshalb die physiologische Rolle der PP5 im Herzen bisher kaum untersucht wurde. Zwar kann PP5 durch Arachidonsäure *in vitro* aktiviert werden, aber die physiologischen Aktivatoren sind unbekannt (Becker et al., 1994, Swingle et al., 2004). Es ist wenig bekannt über die Funktion der PP5 und ihre physiologischen Substrate im Herzen.

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung von potentiellen Substraten der PP5 im Herzen und die Untersuchung der Bedeutung der PP5 im Herzen von Säugetieren.

Dazu soll rekombinante PP5 in *E. coli* exprimiert und Substrate mittels Phosphatase-Assays mit [<sup>32</sup>P]-markierten oder synthetisch phosphorylierten Peptiden bzw. Proteinen in Lösung oder auf einer Peptidmembran ermittelt werden. Vergleichend soll rekombinante PP2C<sub>β</sub> in *E. coli* exprimiert und die Protein-Phosphatase-Aktivität dieser Mg<sup>2+</sup>-abhängigen, ebenfalls mit Arachidonsäure stimulierbaren und im Herz vorkommenden Protein-Phosphatase gegenüber oben genannten Substraten analysiert werden.

Die Protein-Phosphatase-Aktivität im menschlichen Herz gegenüber [<sup>32</sup>P]-Casein in Gegenwart von Arachidonsäure und eine Hemmung der Protein-Phosphatase-Aktivität durch NaF sollen untersucht werden. Die PP5-Expression in Herzen von Spendern und herzinsuffizienten Patienten soll ermittelt werden.

Die Rolle der PP5 soll außerdem an einem Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression der PP5 analysiert werden. Die Auswirkungen einer PP5-Überexpression im Herzen sollen biochemisch und physiologisch untersucht werden. Dazu sollen das Herzgewicht und die Expression verschiedener Proteine im Herzen ermittelt werden. Nach β-adrenerger Stimulierung von Herzmuskelzellen solle die Phosphorylierung von Troponin-Inhibitor und PLB untersucht werden. Es sollen die Herzfunktion und die Phosphorylierung von PLB unter Basalbedingungen und nach β-adrenerger Stimulierung analysiert werden. Im Rahmen des Stressmodells der Lipopolysaccharid-induzierten Sepsis soll die Veränderung der Kontraktilität, der Organgewichte und des Interleukin-6-Spiegels im Blut ermittelt werden.

### 3. Methoden

#### 3.1. Arbeiten mit Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklavierten oder steril filtrierten Lösungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

##### 3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen (BL21(DE3) und XL1<sub>blue</sub>) wurden mit der RbCl-Methode hergestellt und in 100 µl-weise bei -80 °C gelagert (Promega Subcloning Notebook, 2004). Eine einzelne Kolonie von BL21(DE3) bzw. XL1<sub>blue</sub> wurde über Nacht in 2,5 ml LB-Medium bei 225 rpm und 37 °C im Inkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:100 in LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 4.500 xg bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti<sup>TM</sup>30, Rotor C0650, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Das Sediment wurde in 0,4 Volumen eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Danach wurde auf Eis weitergearbeitet. Die resuspendierten Zellen wurden 5 Minuten bei 4 °C inkubiert, danach 5 Minuten bei 4.500 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/25 Volumen (10 ml) eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert, die Zellen wurden 15 - 60 Minuten auf Eis inkubiert und 100 µl-weise in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 gelagert.

##### 3.1.2. Herstellung von Glycerinkulturen

Von einer Übernacht-Kultur wurde 1 ml abgenommen, kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen, weitere 1 ml der Übernacht-Kultur hinzugefügt, kurz zentrifugiert und 500 µl Überstand abgenommen. Das Sediment wurde resuspendiert, 500 µl Glycerin hinzugefügt und die Kultur durch Schwenken gemischt und bei -80 °C gelagert.

##### 3.1.3. Plasmid-DNA-Präparation

Aus 5 ml Bakterienkultur (XL1<sub>blue</sub>) wurden Plasmide durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim und Doly, 1979). 5 ml Bakterienkultur wurden bei 5.000 xg für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, das Sediment wurde mit 100 µl Resuspensionspuffer P1 (RE) versetzt und gemischt (Tisch-Rüttler) bis eine Suspension entstanden war. Danach wurden 200 µl Lysispuffer P2 (LY) hinzugefügt, das Reaktionsgefäß leicht geschwenkt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 150 µl Neutralisationspuffer P3 (NE) wurden zugefügt, das Reaktionsgefäß leicht geschwenkt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 xg und Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Modell 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zwei Volumen Ethanol (100 %) hinzugefügt, gemischt und 20 Minuten bei 13.000 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde 2-mal mit 70%igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei 13.000 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert und danach der Überstand abpipettiert. Die im Sediment enthaltene DNA wurde in einem Vakuum-Concentrator (Concentrator 5301, Eppendorf GmbH, Hamburg,

Deutschland) 5 - 10 Minuten vollständig getrocknet. 50 µl EB-Puffer wurden zum Sediment hinzugefügt und die DNA 5 - 10 Minuten bei 65 °C im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter Schütteln vollständig gelöst. Die DNA-Konzentration und Reinheit wurden photometrisch (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt, das Plasmid durch Restriktionsverdau in einem 1%igem Agarosegel getestet und die DNA bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.4. Transformation und Übernachtskulturen**

100 µl kompetente Zellen (BL21(DE3) oder XL1<sub>blue</sub>) wurden auf Eis aufgetaut, etwa 4 µg Plasmid (Ampicillin-Resistenz) hinzugefügt und das Gemisch 20 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42 °C im Thermomixer und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. 900 µl LB-Medium wurden hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt. Danach wurden die Zellen kurz zentrifugiert, das Medium bis auf 100 µl abgenommen, der Rest resuspendiert und auf eine Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin bei PP5 bzw. 50 µg/ml Ampicillin bei PP2C<sub>β</sub> plattiert und bei 37 °C über Nacht im Inkubator inkubiert.

Eine Kolonie wurde isoliert und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

### **3.2. Arbeiten mit DNA**

#### **3.2.1. DNA-Isolierung aus Mausschwanzbiopsien**

0,5 – 1 cm Schwanzspitze einer Maus wurde nach örtlicher Betäubung mittels Kältespray mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und mit 700 µl TE/SDS-Puffer und 35 µl Proteinase K-Stamm (10 mg/ml in destilliertem Wasser) über Nacht bei 55 °C im Thermomixer geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die genomische DNA von Lipiden und Proteinen zu trennen (Sambrook et al., 1998). Die Probe wurde mit 700 µl Phenol versetzt und gemischt, es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 xg in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Modell 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol-(24:1)-Gemisch hinzugefügt und gemischt. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 13.000 xg für drei Minuten, die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 70 µl Na-Acetat und 700 µl Ethanol (100 %) versetzt, gemischt und 10 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen, 10 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert und im Vakuum getrocknet (5 Minuten), danach in TE-Puffer aufgenommen und 10 Minuten bei 65 °C im Thermomixer geschüttelt bis die DNA gelöst war. Die DNA wurde mindestens 4 Stunden bei 4 °C gelagert und danach die Konzentration und Reinheit photometrisch (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

#### **3.2.2. Restriktionsverdau von DNA**

Beschrieben ist ein Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen, deren Puffersysteme nicht kompatibel waren. Im Falle eines Einfachverdaus entfiel der im Folgenden beschriebene Fällungsschritt. 10 µg DNA wurden drei Stunden im Biometra-PCR-Gerät (T Personal,

Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in einem 20 µl-Ansatz im Puffer für das Restriktionsenzym geschnitten. Nach der Inkubation wurde die DNA mit einem Zehntel-Volumen 3 M K-Acetat pH 5,5 und 2,5 Volumen Ethanol (100 %) gefällt, gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 14.000 xg und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti™30, Rotor F2402H), der Überstand abgenommen, 100 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt, gemischt, für 5 Minuten bei 14.000 xg zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und die DNA im Vakuum getrocknet (5 Minuten). Danach wurde 18 µl steriles destilliertes Wasser zugefügt, die DNA durch Mischen gelöst und ein zweiter Restriktionsverdau für drei Stunden mit einem 2. Restriktionsenzym im passenden Puffer folgte. Eine Zusammenfassung der Restriktionsenzyme ist im Anhang dargestellt.

### **3.2.3. PCR**

PCR-Reaktionen dienten hier entweder zur Einfügung von Restriktions-Schnittstellen in eine vorhandene cDNA und zu deren Amplifizierung oder zur Genotypisierung transgener Mäuse (3.2.3.1).

Die Deckeltemperatur wurde auf 105 °C eingestellt. Die PCR wurde in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen in einem Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Für Tests, ob eine Klonierung erfolgreich war, wurde die oben beschriebene PCR mit etwa 4 µg Plasmid-DNA und 3,5 U GoTaq® DNA-Polymerase (Promega) im Green GoTaq-Reaktionspuffer in einem Ansatz von 50 µl durchgeführt (8.3).

#### **3.2.3.1. PCR zur Genotypisierung der PP5-transgenen Mauslinie**

Verwendete Primer, der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind in 8.4 dargestellt. Alle weiteren Bedingungen entsprachen denen in 3.2.3. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 614 bp.

### **3.2.4. Herstellung einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde**

Als DNA-Sonde diente das PCR-Produkt aus 3.2.3.1 (mindestens 2 ng/µl). Die Sonde wurde mit dem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 50 µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP radioaktiv markiert. 9 µl DNA wurden 10 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert, 1 µl dATP, 1 µl dGTP und 1 µl dTTP, 2 µl Reaktionsmix, 50 µCi [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP und 1 µl Klenow-Enzym wurden zugefügt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und zentrifugiert, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und 10 Minuten bei 65 °C abgestoppt. Zur Reinigung wurde der Markierungsansatz auf 50 µl mit STE-Puffer aufgefüllt und gemischt. 2 µl wurden für die Bestimmung der Einbaurate als Probe abgenommen. Von Gel-Säulen (Amersham ProbeQuant-G50 Micro Columns, GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) wurde der untere Verschluss entfernt, der Deckel etwas geöffnet und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eine Minute bei 735 xg zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und der Markierungsansatz hinzupipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten. Der Durchlauf enthielt die markierte Sonde. 2 µl wurden als Probe „Säule“ für die Bestimmung

der Einbaurate mittels Szintillator („Liquid Scintillation Analyzer“, Cranberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland) abgenommen.

### 3.2.5. Ligation

Das aufgereinigte cDNA-Fragment aus dem Restriktionsverdau (3.2.2) wurde mit einem mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor ligiert.

Die Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und 5 Stunden (pcDNA4-HisMaxA-Vektor, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bzw. über Nacht ( $\alpha$ -MHC-Expressionsvektor (Gergs et al., 2004a) und pJET/blunt-Klonierungsvektor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)) bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Ligation von PCR-Produkten mit dem pJET/blunt-Klonierungsvektor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) erfolgte nach den Angaben des GeneJET™ PCR Cloning Kits (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Es wurde eine Blunting-Reaktion mit 10  $\mu$ l 2 x Reaktionspuffer, 7  $\mu$ l PCR-Produkt und 1  $\mu$ l DNA-Blunting-Enzym für 5 Minuten bei 70 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde einige Sekunden auf Eis gestoppt. Es folgte die Ligation. Zum Mix wurden 1  $\mu$ l pJET1/blunt-Klonierungsvektor (50 ng) und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (5 U, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) hinzugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Ligationsprodukt in Bakterien transformiert (siehe 3.1.4).

### 3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zu einer Probe (Restriktionsverdau oder PCR-Ansatz) wurde 6 x Ladepuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben und diese auf ein 1%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (9  $\mu$ l/100 ml) aufgetragen. Als Größenstandards wurden die DNA-Leitern GeneRuler™ 1 kb-DNA-Leiter und GeneRuler™ 100 bp-DNA-Leiter (beide Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 mA (Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Das Gel wurde unter UV-Licht (312 nm) mit einem AlphaDigiDoc™RT-Geldokumentationssystem (AlphaDigi-Doc™RT-Geldokumentationssystem mit AlphaEase®FC-Software, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) photographiert.

### 3.2.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und mittels DNA-Extraktionskit (#K0513, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gereinigt. Dazu wurden drei Volumen „Binding solution“ hinzugefügt und die Probe 5 Minuten bei 55 °C im Thermomixer inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. 5  $\mu$ l der gründlich gemischten „Silica Suspension“ wurden zur Probe gegeben. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 55 °C, wobei das Gemisch ständig geschüttelt wurde. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Silica-Sediment mit 500  $\mu$ l eiskaltem Waschpuffer aus dem Kit dreimal gewaschen (5 Sekunden Zentrifugation bei maximaler

Geschwindigkeit). Nach der Entfernung des letzten Waschpuffers wurde das Sediment nochmals zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Das Sediment wurde 5 Minuten im Vakuum getrocknet und danach in 20 µl TE-Puffer resuspendiert, 5 Minuten bei 55 °C inkubiert und 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand (Eluat) enthielt die DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde einmal wiederholt, beide Eluate vereint, DNA-Konzentration und Reinheit im photometrisch (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

### **3.2.8. DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen dienten der Überprüfung von klonierten DNA-Sequenzen und wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt (8.5).

### **3.2.9. Aufreinigung endotoxinfreier DNA**

Für eine Oozyteninjektion wurde Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi-Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aus einer 200 ml-Übernacht-Kultur aufgereinigt.

## **3.3. Arbeiten mit RNA**

### **3.3.1. RNA-Extraktion aus Herzgewebe**

RNA wurde mittels TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) isoliert. Dazu wurden frisch entnommene Herzen von Mäusen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde mittels Mikrodismembrator (Mikro-Dismembrator S mit Schüttelbehälter aus PTFE und Mahlkugeln aus Wolframcarbid, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland, siehe 3.4.2) pulverisiert. 50 - 100 mg pulverisiertes Gewebe wurden in 1 ml TRIzol mit einem ULTRA-TURRAX®-Homogenisator (ULTRA-TURRAX-T25-Homogenisator mit Dispergierwerkzeug S25N-8G, IKA®-Labortechnik, Staufen, Deutschland) drei x 30 Sekunden bei 24.000 rpm homogenisiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten, danach wurden 200 µl Chloroform/ml TRIzol zum Ansatz gegeben, 15 Sekunden gemischt und weitere 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze 15 Minuten bei 12.000 xg und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti™30, Rotor F2402H). Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol versetzt, 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und 10 Minuten bei 12.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die im Sediment enthaltene RNA zweimal mit je 900 µl 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 7.500 xg und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die im Sediment enthaltene RNA bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete RNA wurde in 20 µl deionisiertem Formamid aufgenommen, 10 Minuten bei 60 °C gelöst und bei -80 °C gelagert. Verwendetes destilliertes Wasser wurde mit DEPC behandelt.

### 3.3.2. RNA-Gelelektrophorese

Die Gelkammer, der Gelhalter und der Probenkamm wurden zunächst mit Wasser und Seife, dann mit 70 % (v/v) Ethanol, mit DEPC-Wasser und zum Schluss mit Methanol abgewaschen. Es wurde ein 1 % (w/v) Agarosegel mit 1 x MOPS (in DEPC-WASSER), 5 % (v/v) deionisiertes Formamid und 2 µl Ethidiumbromid/50 ml Puffer unter einem Abzug gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x MOPS mit 2 % (v/v) Formaldehyd gefüllt. Es wurden 15 - 30 µg RNA in einem Volumen von 10 - 50 µl aufgetragen. Die RNA wurde bei 37 °C im Thermomixer aufgetaut, bis die Flüssigkeit klar war, danach wurde die entsprechende Menge RNA zu den Ansätzen für das Gel gegeben und diese zwei Minuten bei 95 °C denaturiert, es wurde 1 µl Ladepuffer zugegeben, kurz gemischt und die Ansätze auf Eis abgekühlt. Das gesamte Volumen der Ansätze wurde in das Gel pipettiert und elektrophoretisch bei 60V zwei bis drei Stunden getrennt. Die Trennung wurde danach unter UV-Licht kontrolliert und photographisch dokumentiert.

### 3.3.3. Transfer von RNA-Gelen auf Nylonmembranen

Der Transfer des RNA-Gels auf eine Nylonmembran (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) erfolgte in 10 x SSC-Puffer mittels Vakuum-Transfer für 120 Minuten bei einem Druck von 100 mbar mit einer Membran-Vakuum-Pumpe (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Nylonmembran wurde 5 Minuten in 2 x SSC gespült und die RNA durch Bestrahlung mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> UV-Licht (254 nm, GS Gene Linker, Biorad) auf der feuchten Membran fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran trocken bei 4 °C gelagert.

### 3.3.4. Northern-Hybridisierung

Die Membran wurde für eine Stunde bei 42 °C in einer Inkubationsflasche mit Prähybridisierungs-Lösung im Inkubationsofen (Bachofer Laboratoriumsgeräte GmbH, Reutlingen, Deutschland) drehend inkubiert. Für die Hybridisierung wurde die denaturierte Sonde (5 Minuten bei 95 °C inkubiert) in die Prähybridisierungs-Lösung gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Blot 20 Minuten bei 42 °C mit 2 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS und zweimal mit 1 x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Die Membran wurde feucht eingeschweißt, einen Tag in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und mit dem STORM 860 (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) ausgelesen und ausgewertet.

### 3.4. Arbeiten mit Proteinen

#### 3.4.1. Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

##### 3.4.1.1. PP5

Für die Proteinexpression wurde eine Vorkultur mit 50 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin mit einer Glycerinkultur (pQE80-L-rPP5 (pQE80L-Vektor von Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Inkubator Innova 4200 (New Brunswick Scientific, Edison NY, USA) inkubiert. Die Vorkultur wurde in 250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 30 °C und 225 rpm wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG für 1,5 Stunden induziert. Im Anschluss wurde die Kultur 30 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 2.000 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti<sup>TM</sup>30, Rotor C0650). Das Sediment wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die rekombinante PP5 wurde mit dem Protino-Kit nach Angaben des Herstellers (Machery-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland) für native Bedingungen aufgereinigt, wobei nach der Lyse 0,5 mM PMSF und 1 mM Benzamidin hinzugefügt wurden und der „Elutionspuffer für PP5“ (pH 7,4) 0,5 mM PMSF und 1 mM Benzamidin enthielt. Die Eluate 1 - 3 wurden in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert. Die PP5-Menge in den Eluaten wurde im Vergleich mit einem BSA-Standard mit Coomassie-gefärbten Gelen ermittelt.

Um eine höhere Reinheit und Menge der exprimierten Phosphatase zu erhalten, wurden sechs 5 ml-Vorkulturen in LB-Medium mit 100 µg/µl Ampicillin und 20 µl PP5-Glycerinkultur für 5 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zu diesen Kulturen wurden je 100 ml YT-Medium mit 100 µg/µl Ampicillin hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden jeweils in 1l YT-Medium mit 100 µg/µl Ampicillin überführt und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,5 inkubiert, es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 28 °C und anschließend 4 Stunden Induktion mit 1 mM IPTG bei 28 °C. Die Kulturen wurden bei 6.000 xg und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert, die Sedimente vereinigt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Sediment wurde auf Eis aufgetaut und mit Dialysepuffer bis auf 50 ml aufgefüllt, eine Tablette Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde hinzugefügt. Das resuspendierte Sediment wurde 4 mal in einer Frenchpress (French Pressure Cell Press, SLM Instruments, Rochester, NY, USA) homogenisiert, danach wurden auf Eis 50 µl Benzonase hinzugefügt und 45 Minuten bei 135.000 xg zentrifugiert (Zentrifuge SORVALL WX Ultra Series, Rotor: T647,5, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Eine NiNTA-Säule wurde mit Dialysepuffer äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde mit 50 ml Dialysepuffer verdünnt auf einen pH von 7,4 eingestellt und auf die Säule gegeben. Es folgten drei Waschschrte mit Dialysepuffer, mit Waschpuffer und mit Dialysepuffer. Zur Kontrolle wurden Durchlauf und Waschpuffer in 5 ml-Fractionen gesammelt. Es wurde mit einem Gradient aus 100 ml Dialysepuffer und Elutionspuffer (mit

250 mM Imidazol) eluiert. Das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Säule wurde anschließend regeneriert (bidestilliertes Wasser, 100 mM EDTA, 10 mM NiSO<sub>4</sub>, bidestilliertes Wasser). Aliquots der 5 ml-Fractionen wurden auf einem 15%igem Trenngel und 4,6%igem Sammelgel bei 34 mA aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die Aktivität der exprimierten und gereinigten PP5 im Eluat wurde mittels pNPP-Assay bestimmt. Eine 20 mM pNPP-Lösung wurde in pNPP-Puffer mit bzw. ohne 0,2 mM Arachidonsäure hergestellt. 20 µl der 5 ml-Fractionen wurden zusammen mit 100 µl pNPP-Lösung mit bzw. ohne Arachidonsäure bei Raumtemperatur auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Die p-Nitrophenolat-Freisetzung wurde spektrophotometrisch bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Spektrometer MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) bei Raumtemperatur gemessen. Anfangsanstiege der Reaktionen wurden mittels linearer Regression ermittelt. Basierend auf Aktivität und Gelelektrophorese wurden die Proben 52 bis 67 vereint, eine Tablette Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt, in einen mit destilliertem Wasser gespülten Dialyseschlauch (Servapor®, SERVA, Heidelberg, Deutschland) gegeben und über Nacht bei 4 °C in vorgekühlten Dialysepuffer (zweimal gewechselt) dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Säule gegeben und mit einem Gradienten von 0 – 500 mM KCl in Dialysepuffer aufgetrennt. Basierend auf einer Gelelektrophorese und dem pNPP-Assay wurden die Fractionen 11 – 17 vereint und in 200 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

#### 3.4.1.2. PP2C<sub>β</sub>

50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Inkubator inkubiert. Die Übernacht-Kultur wurde in 250 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,8 inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG für drei Stunden induziert. Die Kultur wurde bei 2.000 xg für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti™30, Rotor C0650). Das Sediment wurde in 6 ml LEW-Puffer resuspendiert und mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und unter ständigem Rühren auf Eis 30 Minuten lysiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung (10 x 15 Sekunden). Das Lysat wurde zweimal 30 Minuten bei 10.000 xg und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti™30, Rotor C1015). Eine Säule aus dem Protino-Kit wurde mit 4 ml LEW äquilibriert, das Lysat auf die Säule gegeben, die Säule zweimal mit 4 ml LEW gespült und mit dreimal 3 ml „Elutionspuffer für PP2C“ eluiert. Die Eluate wurden 1:5 mit Substratpuffer für PP2C verdünnt und in Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der Eluate wurde mit Coomassie-gefärbten Gelen ermittelt.

#### 3.4.2. Herstellung von Homogenaten

Bei -80 °C gelagerte Mausherzen bzw. Herzgewebe wurden unter flüssigem Stickstoff im Mikro-Dismembrator eine Minute bei 2.100 rpm pulverisiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Herz vollständig pulverisiert war. Das Pulver wurde bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Homogenaten für Westernblots wurde eine Spatelspitze Pulver in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 100 µl 10 mM NaHCO<sub>3</sub> und 21,3 µl 20 % SDS (w/v) hinzugefügt und gemischt bis das gesamte Pulver gelöst war. Die Proben wurden drei x 15

Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls Homogenisator HD2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 30 Minuten bei 13.000 xg bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Modell 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (3.4.3). Die Homogenate konnten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Für eine SDS-Gelelektrophorese wurden 100  $\mu\text{g}$  Probe mit Homogenisationspuffer auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 50  $\mu\text{l}$  2 x Ladepuffer für SDS-Page ohne SDS und 6 mg/ml DTT hinzugefügt, die Reaktionsgefäße kurz geschüttelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Auftragen auf das Proteingel gelagert.

Für eine Membranpräparation mit Trennung von Zytosol- und Membranfraktion wurden drei Spatelspitzen Gewebepulver eines unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff im Mikrodismembrator pulverisierten Herzens in 1 ml Puffer II aufgenommen und auf Eis gemischt bis das Pulver gelöst war. Nach der Ultraschallhomogenisation folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 13.000 xg und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti<sup>TM</sup>30, Rotor F2402H) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, als Zytosolhomogenat bezeichnet und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zytosolhomogenate wurden nach Bartel et al., 2000 behandelt. Zum Sediment wurden 100  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 21,3  $\mu\text{l}$  20 % SDS (w/v) hinzugegeben, gemischt bis das Sediment vollständig resuspendiert war und 3 x 15 Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonopuls Homogenisator HD2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) behandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 xg bei Raumtemperatur (Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, als Membranhomogenat bezeichnet und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proteinkonzentration wurden bestimmt (3.4.3).

Zur Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten wurde ein SDS-freies Homogenat wie oben hergestellt. Dazu wurde etwa das 10fache Volumen des Pulvers an Puffer II zum Gewebepulver auf Eis zugegeben, vollständig vermischt und mit einem Ultraschall-Homogenisator auf Eis homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 17.000 xg und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Zentrifuge Beckman Avanti<sup>TM</sup>30). Der Überstand wurde auf Eis abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, portioniert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **3.4.3. Proteinbestimmungen**

Die Proteinbestimmung erfolgte bei SDS-haltigen Proben nach Lowry et al., 1951 und bei Proben ohne SDS nach Bradford, 1976.

### **3.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Westernblot**

Die zu analysierenden Proben wurden, wie zuvor beschrieben (3.4.2), vorbereitet und bei 50 mA und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  elektrophoretisch in einer Hoefer SE600 Elektrophorese-Einheit (Hoefer SE 600, Hoefer, San Francisco, CA, USA) getrennt (Stromquelle: Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Für Phospholamban-Nachweise bestanden

die Gele aus einem 12%igem Porzio-Trenngel und einem 4%igem Lämmli-Sammelgel. Für Nachweise größerer Proteine wurden 10%ige Porzio-Trenngele und 4%ige Lämmli-Sammelgele benutzt (Porzio und Pearson, 1977). Molekulargewichtsstandards wurden vorher 10 Minuten bei 95 °C hitzedenaturiert, Proben für Phospholamban-Nachweise wurden nicht hitzedenaturiert. Andere Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Elektrophorese wurde in Elektrophoresepuffer durchgeführt bis die Lauffront etwa 1 cm vor dem unteren Ende des Gels war. Die Gele wurden bei 0,28 A, 8 V und 16 h bei 4 °C in einer Hoefer TE62 Tank-Transfer-Einheit (Hoefer, San Francisco, CA, USA, Stromquelle: Biorad Modell 200/2.0 Stromquelle, Biorad, München, Deutschland) mit Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) transferiert. Der Transfer wurde darauf optimiert, daß sowohl SERCA (94 kDa) als auch Phospholamban (25 kDa) im Westernblot gut nachweisbar waren. Die Qualität des Transfers wurde mittels Färbung mit Ponceau-Rot überprüft.

### **3.4.5. Coomassie-Färbung**

Gele wurden eine Stunde in Coomassie-Färbelösung gefärbt, über Nacht in Entfärbelösung entfärbt, mit einem Scanner (CanoScan LiDE 35, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) eingescannt und im Geltdrockner (Biorad GmbH, München, Deutschland) bzw. zwischen Gelfolien (Biorad GmbH, München, Deutschland) eingespannt und getrocknet.

### **3.4.6. Immunologische Identifizierung von Proteinen und Phosphorylierungszuständen**

Die Größenbereiche für das nachzuweisende Protein wurden aus der Ponceau-Rot-gefärbten Membran ausgeschnitten (8.7).

Die Membranstreifen wurden zweimal 10 Minuten mit TBST gespült und danach eine Stunde mit 2 % (w/v) BSA bzw. 5 % (w/v) Milchpulver in TBST geblockt (8.8). Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper gelöst in Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C. Die Membranstreifen wurden dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen, zwei Stunden mit dem 2. Antikörper (1:1000) in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal 10 Minuten mit TBST und zweimal zwei Minuten mit AP-Puffer gespült. Für quantitative Auswertungen wurden die Membranstreifen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ECF (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) inkubiert und die Fluoreszenzsignale mit dem PhosphorImager STORM 860 (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) detektiert. Ansonsten erfolgte der Nachweis des gebundenen 2. Antikörpers mit der NBT/BCIP-Farbreaktion.

Die Quantifizierung der Signale (Proteinbanden) erfolgte mittels dreidimensionaler Densitometrie mit der ImageQuant®-Software (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland), unspezifische Hintergrundsignale wurden vom Signal subtrahiert.

PP2C $\beta$  wurde mittels Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence, ECL) nachgewiesen. Der sekundäre Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, wodurch bei Zugabe des Ansatzes für die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase, Licht entsteht. Um die Entwicklung der Filme zu ermöglichen, wurden die Membranstreifen nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper eine Minute in einem frisch-hergestellten Ansatz für die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase inkubiert. Dieser Ansatz enthielt 0,009 % Wasserstoffperoxid,

1,25 mM Luminol und 0,225 mM p-Cumarsäure in 100 mM Tris-HCl pH 8,5. Nach der Inkubation wurde der Ansatz abgenommen, die Membranen kurz mit 100 mM Tris-HCl pH 8,5 gespült. Es erfolgte eine Exposition auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) für bis zu 30 Minuten. Der Film wurde in Entwickler-Lösung (Kodak) entwickelt bis Banden sichtbar waren, in Fixierlösung (Kodak) fixiert, mit Wasser gespült und danach getrocknet.

Um die Membran ein zweites mal zu verwenden, mussten die Antikörper des ersten Versuchs entfernt werden. Für das sogenannte Stripping von Membranstreifen wurden die Membranen drei x 10 Minuten mit TBST gespült, 30 Minuten mit „Stripping-Puffer“ bei 50 °C inkubiert, zwei Stunden mit TBST gespült und danach erneut geblockt.

### **3.4.7. 2D-Gelelektrophorese**

Von je einer Spatelspitze Herzgewebepulver aus den Versuchen in 3.5.5 (n = 3 WT basal und TG basal) wurden Homogenate mit 10 mM Tris-HCl pH 7,4 hergestellt, mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt und mit Massenspektrometrie ausgewertet (Volke und Hoffmann, 2006a, Volke und Hoffmann, 2006b). Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Hoffmann (Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum der Universität Leipzig).

### **3.4.8. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten**

#### **3.4.8.1. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [<sup>32</sup>P]-Casein**

Radioaktiv markiertes Casein wurde nach der Methode von McGowan und Cohen, 1988 hergestellt. Dazu wurden 10 mg Casein in 1 ml Phosphorylierungsmix 8 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml 100 mM EDTA – 100 mM Natrium-Pyrophosphat pH 7,0 gestoppt. Der Ansatz wurde mit einer mit G-50-Puffer äquilibrierten Sephadex-G50 Superfine-Säule (15 x 1 cm) aufgetrennt. Es wurden 30 Fraktionen à 500 µl gesammelt. Es wurde die Proteinkonzentration (E280) im Photometer und die Gesamtaktivität mit einem Szintillator („Liquid Scintillation Analyzer“, Cranberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Die Proben aus dem Bereich des Maximums der Gesamtaktivität (etwa Proben 10 – 12) wurden vereinigt, bei 4 °C gelagert und für weitere Versuche verwendet. Von dieser Probe wurde die Gesamtaktivität („Total Counts“) und die unspezifische Aktivität („Blank“) bestimmt. Protein-Phosphatase-Aktivitäten wurden in einem Volumen von 50 µl in PP-Basispuffer mit 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,25 - 1 µl [<sup>32</sup>P]-Casein und 1 - 5 µg PP5 bzw. 26-130 ng PP2C gemessen. Die Proben wurden 20 Minuten bis eine Stunde inkubiert, mit 20 µl 50 % (w/v) TCA und 30 µl 1 mg/ml BSA gefällt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und 5 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert. Freigesetztes [<sup>32</sup>P] wurde in 70 µl des Überstandes mit einem Szintillator („Liquid Scintillation Analyzer“, Cranberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland) gemessen. Ansätze mit PP5 wurden mit 200 µM Arachidonsäure durchgeführt, als Kontrolle diente 2 % (v/v) Ethanol. Versuche mit PP2C wurden in Gegenwart von 0,7 mM Magnesiumacetat und 500 µM Arachidonsäure durchgeführt. Die Gesamt-Aktivität und unspezifische Aktivität wurden bei jedem Versuch bestimmt und enthielten kein

Enzym/Homogenat. Die Probe für die Bestimmung der unspezifischen Aktivität wurde mit TCA gefällt, zur Probe zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurde destilliertes Wasser anstelle von TCA gegeben. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Aktivität der PP5 in Gegenwart von 50 mM NaF (Serin/Threonin-Protein-Phosphatase-Hemmstoff) untersucht.

### **3.4.8.2. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber Substraten auf einer Peptidmembran**

Durch Datenbank- und Literatursuche wurden potentielle Substrate der PKA im Herzen und deren Phosphorylierungsstellen ermittelt. Von diesen Substraten wurden 19 Aminosäuren lange Peptide im Bereich der Phosphorylierungsstelle abgeleitet und im Rahmen einer Kooperation von Dr. S. Rothemund (IZKF Leipzig) auf einer Zellulosemembran synthetisiert (Werner et al., 2007). Die Synthese der Peptide erfolgte mittels automatisierter SPOT-Synthese (Frank et al., 1996) mit einem Robotor-System (Abimed Analysetechnik, Intavis AG, Köln, Deutschland) direkt auf der Membran. Cellulose-Membranen mit aus 8 – 10 Ethylenglykol-Einheiten derivatisierten Polyethylen-Spacern wurden von Intavis bezogen. Die Peptide wurden mittels Fmoc-Chemie ausgehend vom C-Terminus des Peptides synthetisiert. Dreifach-Kopplungen von Aminosäuren wurden mit Diisopropylcarbodiimid und N-Hydroxybenzotriazol-Aktivierung in DMF durchgeführt. Die Kopplungszeit betrug 10 Minuten, danach wurde 10 Minuten mit 20%igem Piperidin in DMF deblockiert. Die Analyse der freien Amino-Funktionen wurde nach jedem Zyklus mit einer Lösung aus Bromphenolblau in DMF durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wurden alle Peptide N-terminal mit 2%igem Essigsäure-Anhydrid in DMF acetyliert. Zum Schluss wurden die geschützten Seitenketten mit einer Mischung aus 95 % Trifluoressigsäure und 5 % Dichlormethan für 30 Minuten wieder freigelegt. Ein einzelner Peptidspot auf der Cellulosemembran war etwa 0,5 cm<sup>2</sup> groß und enthielt 50 nmol Peptid. Die Sequenzen der Peptide sind im Abschnitt 8.11 dargestellt. Die immobilisierten Peptide wurden als Phosphatase-Substrate untersucht.

Die Membran wurde, wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben, gestrippt, für zwei Stunden in Rotiblock (Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland) 1:10 blockiert, zwei mal kurz mit PP-Basispuffer gespült und über Nacht mit Phosphorylierungsmix inkubiert. Der Phosphorylierungsmix enthielt 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,2 µM ATP, 2500 Units PKA, 0,25 mCi [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP und 10 mM Magnesiumacetat-Tetrahydrat in PP-Basispuffer. Der Phosphorylierungsmix wurde am nächsten Morgen abgenommen, die Membran drei mal 10 Minuten mit TBST gespült, feucht eingeschweißt und in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und mit dem STORM 860 (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) ausgelesen.

Eine radioaktiv markierte Membran wurde in zwei gleiche Teile geteilt, 10 Minuten in TBST gespült, gestrippt, 10 Minuten in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und mit dem STORM 860 ausgelesen. Die Membranen wurden zwei Stunden mit Rotiblock 1:10 blockiert. Danach wurden die Membranen zwei mal kurz mit PP-Basispuffer gespült und über Nacht bei 30 °C mit PP5 mit Arachidonsäure oder Ethanol inkubiert. Für eine Inkubation mit rekombinanter PP2C $\beta$  wurden die Membranen zweimal kurz mit Substratpuffer für PP2C

gespült und über Nacht bei 30 °C mit PP2C $\beta$  mit Magnesiumacetat oder unter Kontrollbedingungen inkubiert.

Der Ansatz für die Inkubation mit PP5 und Arachidonsäure enthielt 2 mg rekombinante PP5 Eluat 1, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,2 mM Arachidonsäure und wurde mit PP-Basispuffer auf 10 ml aufgefüllt. Der Ansatz für die Inkubation mit PP5 und Ethanol enthielt 0,25 % (v/v) Ethanol anstelle von Arachidonsäure. Der Ansatz für die Inkubation mit PP2C $\beta$  und Magnesiumacetat enthielt 10,4  $\mu$ g rekombinante PP2C $\beta$  Eluat 1, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,7 mM Magnesiumacetat und wurde mit Substratpuffer PP2C auf 10 ml aufgefüllt. Der Kontrollansatz enthielt steriles destilliertes Wasser anstelle von Magnesiumacetat.

Am nächsten Morgen wurde die Inkubationslösung abgenommen und die Membranen dreimal 10 Minuten mit TBST gespült, feucht eingeschweißt und 30 Minuten in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und diese mit dem STORM 860 (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) ausgelesen.

Die Spots wurden mit ImageQuant®-Software und den unten stehenden Gleichungen ausgewertet.

**Gleichung 1 (Änderung der Signalstärke jeder einzelnen Membran während des Versuchs):**

$\% \text{ von vor Inkubation mit Phosphatase} = \text{Wert des Spots nach Inkubation mit Phosphatase} / \text{Wert des Spots vor Inkubation mit Phosphatase} \times 100$

**Gleichung 2 (Vergleich der Membran mit aktiver PP5 mit der Kontrollmembran):**

$\% \text{ Arachidonsäure} - \% \text{ Ethanol} = \% \text{ von vor Inkubation mit PP5 (Arachidonsäure)} - \% \text{ von vor Inkubation mit PP5 (Ethanol)}$

**Gleichung 3 (Vergleich der Membran mit aktiver PP2C $\beta$  mit der Kontrollmembran):**

$\% \text{ Magnesiumacetat} - \% \text{ Kontrolle} = \% \text{ von vor Inkubation mit PP2C}\beta \text{ (Magnesium)} - \% \text{ von vor Inkubation mit PP2C}\beta \text{ (Kontrolle)}$

Da Substrate, deren Phosphorylierungsstelle ein Threoninrest war, auf den radioaktiv markierten Peptidmembranen schlecht markiert wurden, wurden diese Substrate als Peptide mit Phospho-Threonin auf Peptidmembranen synthetisiert. Die Dephosphorylierung erfolgte wie oben beschrieben. Der Phosphorylierungszustand der Peptide wurde mittels Westernblot mit anti-phospho-Threonin-Antikörper nachgewiesen. Die Entwicklung der Membranstreifen erfolgte mit ECF. Der Phosphorylierungszustand der PP5-behandelten Peptide mit Ethanol bzw. Arachidonsäure wurde verglichen. Als Kontrolle wurde die Membran ohne PP5 und mit Arachidonsäure behandelt.

**3.4.8.3. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [ $^{32}$ P]-PLB**

[ $^{32}$ P]-markiertes rekombinantes Phospholamban wurde nach der Methode von Neumann et al., 1999 hergestellt. Der Reaktionsansatz enthielt 200  $\mu$ l rekombinantes Phospholamban (0,044 mg), 2500 U PKA (NEB), 0,1 mCi [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP, 0,2  $\mu$ M ATP (kalt), 0,003 mM DTT, 0,16 % 2-Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl $_2$  (pH 7,4). Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 30 °C inkubiert, kurz auf Eis gestoppt und dreimal 6 Stunden dialysiert. Der

Phosphorylierungszustand wurde durch Gelelektrophorese und nachfolgende Autoradiografie ermittelt. Der Versuchsansatz enthielt [<sup>32</sup>P]-markiertes Phospholamban, 2,5 µg PP5, 200 µM Arachidonsäure oder 2 % (v/v) Ethanol als Kontrolle in 50 mM Tris-HCl pH 7,4 in einem Ansatz von 50 µl. Die Ansätze wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 30 °C auf einem Heizblock inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 x Ladepuffer für SDS-Page mit SDS und 3 mg/ml DTT. Die Proben wurden gemischt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Elektrophorese der Proben erfolgte in einem 12%igen Porzio-Trenngel und einem 4%igem Sammelgel bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Es folgte eine Färbung des Gels mit Coomassie für eine Stunde und eine Entfärbung über Nacht. Das Gel wurde in Folie eingeschweißt, 30 Minuten in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und im STORM 860 (beides GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland) ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit ImageQuant®-Software (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland). Für eine Substratabhängigkeit wurden 1 bis 5 µl [<sup>32</sup>P]-Phospholamban und 2,5 µg PP5 verwendet. Als Kontrolle wurde ein Ansatz von 5 µl [<sup>32</sup>P]-Phospholamban mit alkalischer Phosphatase behandelt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung wurde mit 2,5 µl [<sup>32</sup>P]-markiertem Phospholamban und 2,5 µg PP5 durchgeführt. Zeiten waren 30 Minuten, eine Stunde, 1,5 Stunden, zwei Stunden, drei Stunden und 4 Stunden.

#### **3.4.8.4. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber Threonin<sup>17</sup> phosphoryliertem PLB-Peptid**

Die Sequenz des Peptides entsprach den 12 C-terminalen Aminosäuren von PLB (RSAIRRAST(PO<sub>4</sub>)IEY). Thr<sup>17</sup>-phosphoryliertes Phospholamban-Peptid (0,5, 1 und 2 µg) wurde in 500 mM Tris-Puffer pH 7,4 mit 2,5 µg PP5 mit 200 µM Arachidonsäure bzw. als Kontrolle mit 2 % (v/v) Ethanol 4 Stunden inkubiert, je dreimal 6 µl wurden auf eine Membran getropft, getrocknet und die Phosphorylierung mit dem anti-phospho-Threonin-Antikörper nachgewiesen. Die Entwicklung der Membranstreifen erfolgte mit ECF. Der Phosphorylierungszustand des Peptids bei Behandlung mit Ethanol bzw. Arachidonsäure wurde verglichen. Als weitere Kontrolle wurde der Versuch mit 2 µg Peptid mit PP2C<sub>β</sub> durchgeführt.

#### **3.4.8.5. Bestimmung von Protein-Phosphatase-Aktivitäten gegenüber [<sup>33</sup>P]-DARPP-32**

[<sup>33</sup>P]-markiertes DARPP-32 wurde von Susann Kilka (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Phosphorylierungsmix enthielt: 19,6 µM rekombinantes DARPP-32 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 75 µCi [<sup>33</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland), 0,25 µl Proteaseinhibitoren (eine Tablette in 1 ml gelöst, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 17500 U PKA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 200 µM ATP in PKA-Puffer (Ansatz von 50 µl). Der Ansatz wurde bei 30 °C über Nacht auf einem Heizblock inkubiert und mittels Mini Quick Spin Columns (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gereinigt.

Protein-Phosphatase-Aktivitäten wurden in einem Volumen von 5 µl gemessen. Der Ansatz enthielt 1 µl [<sup>33</sup>P]-markiertes DARPP-32 in entsprechender Verdünnung, 1 µl PP5 (Eluat 1), 200 µM Arachidonsäure oder 2 % (v/v) Ethanol als Kontrolle und PP-Basispuffer. Der Ansatz wurde mit einem Tisch-Rüttler gemischt, kurz bei 4 °C zentrifugiert und bei 30 °C inkubiert. Für die Substratabhängigkeit wurde 20 Minuten und für die Zeitabhängigkeit 5, 10 und 20 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 20 µl 20 % (w/v) TCA und 1,5 µl 100 mg/ml BSA hinzugefügt, gemischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert (Zentrifuge Beckman Avanti<sup>TM</sup>30, Rotor F2402H). Der Überstand wurde abgenommen und freigesetzte Radioaktivität mit Szintillator in Szintillationsgefäßen im Szintillator („Liquid Scintillation Analyzer“, Cranberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland) gemessen. Das Sediment wurde mit 50 µl eiskaltem Aceton versetzt, gemischt und 10 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Sediment wurde Szintillator gegeben, resuspendiert und in ein Szintillationsgefäß überführt und ebenfalls im Szintillator gemessen.

#### **3.4.9. Phosphorylierung von PP5 mit PKA**

Es wurde untersucht, ob PP5 durch PKA phosphoryliert werden kann (8.9).

Die Ansätze wurden gemischt und über Nacht bei 30 °C auf einem Heizblock inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde ¼ Volumen 5 x Ladepuffer für SDS-Page mit SDS mit 15 mg/ml DTT zugegeben, die Ansätze gemischt und 10 Minuten bei 95 °C hitzedenaturiert. Der Nachweis erfolgte mittels Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung, Exposition in einer PhosphorImager-Kassette und Auswertung mittels ImageQuant®-Software.

#### **3.4.10. Rückphosphorylierung**

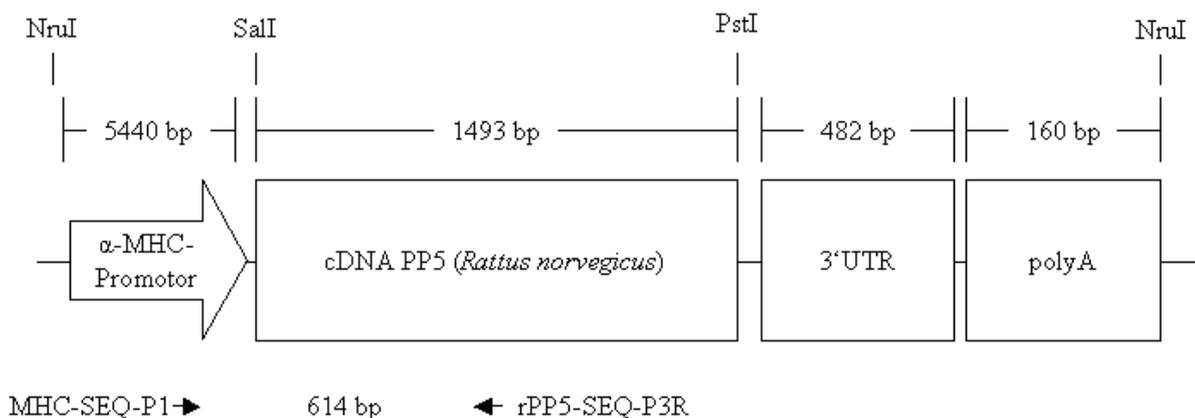
Mit 10<sup>-6</sup> M Isoprenalin- bzw. mit Puffer behandelte Herzen (siehe 3.5.5) der Linie PP5-K20 wurden, wie in 3.4.2 beschrieben, homogenisiert. Jeweils 200 µg Probe wurden elektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot wurde mit „Stripping-Puffer“ behandelt (3.4.6) und zwei Stunden mit Rotiblock, 1:10 verdünnt, blockiert. Nach zweimaligem kurzen Spülen des Membranstreifens in PP-Basispuffer folgte eine Inkubation mit Phosphorylierungsmix über Nacht. Der Phosphorylierungsmix enthielt: 2,1 mg/ml Magnesiumacetat, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,2 µM ATP (kalt), 250 U PKA und 0,5 mCi [<sup>32</sup>P]-ATP in PP-Basispuffer. Am nächsten Morgen wurde der Phosphorylierungsmix abgenommen, die Membran drei x 10 Minuten mit TBST gespült, eingeschweißt, eine Stunde in einer PhosphorImager-Kassette exponiert, im STORM 860 ausgelesen und mit ImageQuant®-Software ausgewertet (GE Healthcare Europe GmbH, München, Deutschland).

### **3.5. Arbeiten mit Tieren**

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Durchführung der Organentnahme und Tierversuchen lagen vor (Aktenzeichen: 42502-02-691 MLU und 42502-5.14 MLU).

### 3.5.1. Tierlinien

Für die Versuche wurden transgene Mauslinien (CD-1-Stamm) mit herzspezifischer Überexpression der PP5 benutzt. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der  $\alpha$ -MHC-PP5-Expressionskassette. Die cDNA der Ratten-PP5 mit deren 3'-untranslatierten Region wurde freundlicherweise von Prof. M. Chinkers (University of South Alabama, Mobile, AL, USA) zur Verfügung gestellt. Nachdem die cDNA aus dem Klonierungsvektor (pET-16b-Vektor, Novagen, Darmstadt, Deutschland) ausgeschnitten wurde, wurden die Enden geglättet und die cDNA in die EcoICR-Restriktions-Schnittstelle der  $\alpha$ -MHC-Promotor-Expressionskassette mit dem SV40 Transkriptions-Terminator ligiert. Das Transgen, bestehend aus dem  $\alpha$ -MHC-Promotor, der kompletten Protein-kodierenden Region der Ratten-PP5 und 483 bp der 3'-untranslatierten Region, und der SV40-Polyadenylierungssequenz, wurde aus dem Plasmid als 7,7 bp NruI-Fragment isoliert und für eine Mikroinjektion in befruchtete Maus-Oozyten (CD1, Memorec, Köln, Deutschland) benutzt. Mäuse, die für das Transgen positiv waren, wurden durch Southern-Blot und PCR der genomischen DNA der Schwanzspitze identifiziert. Die herzspezifische Expression wurde durch den  $\alpha$ -MHC-Promotor erreicht. Der  $\alpha$ -MHC-Promotor gewährleistet eine geringe Expression während der Embryonalentwicklung und eine starke postnatale Expression der von diesem Promotor kontrollierten Gene (Gulick et al., 1991). Als Kontrollen dienen gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere. Benutzte Tierlinien waren PP5-K20 und PP5-K14, wobei die Linie PP5-K20 eine stärkere Überexpression des Transgens als die Linie PP5-K14 zeigte (4fache vs. 3fache Überexpression, Gergs et al., 2004b). Tiere wurden in schallisolierten Räumen im 12:12 Licht-Dunkel-Zyklus mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser versorgt und zur Unterscheidung mit Ohrmarken markiert.



**Abbildung 4:** schematische Darstellung der  $\alpha$ -MHC-PP5-Expressionskassette, die zur Herstellung der transgenen Mäuse verwendet wurde. Mittels PCR mit spezifischen Primern (MHC-SEQ-P1 und rPP5-SEQ-P3R) wurde das Transgen in genomischer DNA der Maus nachgewiesen (Produktgröße: 614 bp).

### 3.5.2. Narkose und Herzpräparation

Mäuse wurden mit 50 - 75 mg/kg Körpergewicht Pento-Barbital i.p. und 500 U Heparin i.p. narkotisiert. Mit einer Pinzette wurde die Reflexfreiheit bei Zehenreizung überprüft. Erst dann wurde die Bauchdecke eröffnet und das Herz zügig entnommen, in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gespült, von Blutresten befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

Für Perfusionen von Herzen im isolierten perfundierten Herzmodell wurde eine 0,67 g/ml Urethan-Stammlösung frisch hergestellt. Den Mäusen wurde von dieser Stammlösung das 4,9 fache in  $\mu\text{l}$  des Körpergewichtes (g) i.p. gespritzt. In eine Krebs-Henseleit-Puffer (Grupp et al., 1998) enthaltende Schale, in der das Herz präpariert wurde, wurden 3 - 4 Tropfen Heparin (5000 U/ml) gegeben.

### 3.5.3. Applikation von Lipopolysaccharid (LPS)

Mäusen wurden i.p. 27  $\mu\text{g}$  Lipopolysaccharid/g Körpergewicht in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung oder als Kontrolle 0,9%ige (w/v) NaCl-Lösung appliziert (jeweils in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$ ). Die Körpertemperatur wurde am Versuchstag 0 und am Versuchstag drei mit einem Thermometer (Comfort Touch Stirnthermometer, Kaz Europe SA, Lausanne, Schweiz) gemessen. Nach drei Tagen wurden die Tiere mit 50 - 75 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital i.p. narkotisiert und erhielten 500 U Heparin. Durch Öffnung des Bauch- und Brustraumes wurden das Herz, ein Teil der Leber, beide Nieren, die Milz und Blut entnommen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herz wurde im isolierten perfundierten Herzmodell (3.5.5) anterograd perfundiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle entnommenen Organe wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Mittels Feinwaage wurden die Organgewichte ermittelt. Das Blut (etwa 450  $\mu\text{l}$ ) wurde mit 50  $\mu\text{l}$  2000 U/ $\mu\text{l}$  Heparin aufgenommen und im Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Blut auf Eis gelagert. Das Blut wurde für 10 Minuten bei 2.500 xg in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Modell 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand (Plasma) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

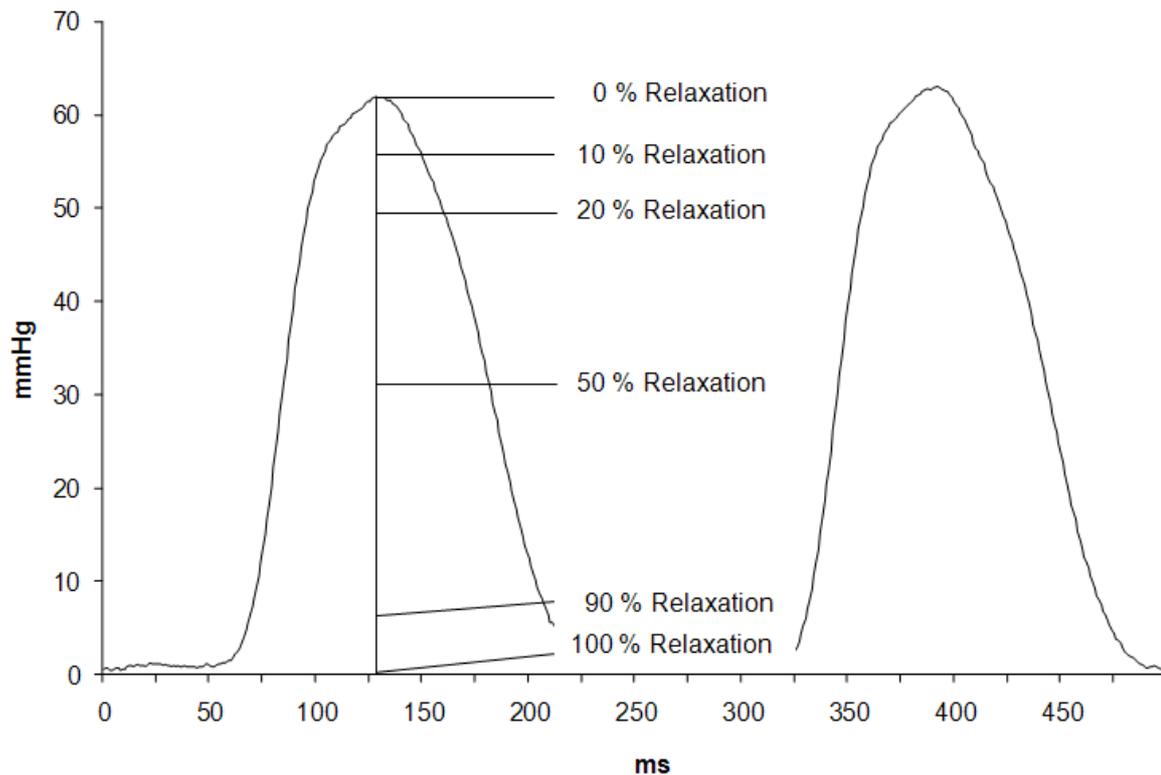
### 3.5.4. Bestimmung von Interleukin-6-Konzentrationen

In Plasmaproben aus 3.5.3 wurde die IL6-Konzentration mit Hilfe eines funktionalen 7TD1-Assays für den IL6-Nachweis bestimmt (Schromm et al., 1998 und 2000, Westphal, 2003). Die Bestimmung wurde im Labor von Dr. H. Loppnow (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Ernst-Grube-Straße 40, 06120 Halle) durchgeführt. Mit Hilfe der IL6-abhängigen murinen B-Zelllinie 7TD1 wurde die biologische IL6-Aktivität bestimmt. Kultivierung der Zelllinie erfolgte in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) fetales Kälberserum, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (w/v) L-Glutamin, 100 pg IL-6/ml und 0,5  $\mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol. Proben bzw. der IL6-Standard (10 ng/ml) wurden in 96-Well-Mikrotiter-Platten in 50  $\mu\text{l}$  7TD1-Verdünnungsmedium (RPMI 1640, 2 % (v/v) fetales Kälberserum, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (w/v) L-Glutamin) stufenweise in 1:4 Schritten verdünnt. Nach

zweimaliger Zentrifugation (150 x g, 10 Min) wurden die 7TD1-Zellen in Zellmedium (RPMI 1640, 18 % (v/v) fetales Kälberserum, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (w/v) L-Glutamin, 1  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol) aufgenommen. 50  $\mu$ l Probe oder Standard wurden zusammen mit 50  $\mu$ l Zellsuspension (40.000 Zellen/ml) 72 Stunden bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l MTT-Lösung pro Well (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid, 5 mg/ml in PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) folgte eine weitere Inkubation für 4 Stunden. Gestoppt wurde mit 100  $\mu$ l Stop-Lösung/Well (5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Dimethylformamid) und die Extinktion der Proben wurde im ELISA-Meßgerät (Spectra-Flour, Tecan, Berlin, Deutschland) bei 540 nm bestimmt. Anhand des IL6-Standards wurde die IL6-Aktivität der Proben bestimmt.

### **3.5.5. Messung kontraktile Parameter des Herzens an isolierten perfundierten Mäuseherzen**

Mit der Methode des isolierten perfundierten Herzens („isoliert-perfundiertes Arbeit-leistendes Herz“-Modell oder “Working-heart“-Modell) ist es möglich, die Myokardfunktion unabhängig von autonomem oder hämodynamischem Feedback oder anderen Kompensationen zu untersuchen (Grupp et al., 1998). Die Methode wurde, wie in Grupp et al., 1998 beschrieben, durchgeführt. Als Nachlast wurde 50 mmHg und als Vorlast 5 ml/Minute eingestellt. Als Nachlast wird der Aortendruck und als Vorlast die Füllung des Herzens bezeichnet (Silbernagl und Despopoulos, 2003). Nach der Präparation des Herzens wurde dieses mit Krebs-Henseleit-Puffer (Grupp et al., 1998) zunächst im Langendorff-Modus (retrograd) über die Aorta perfundiert und danach 30 Minuten anterograd über den linken Vorhof perfundiert, es folgte die Applikation einer Substanz bzw. von Puffer für 5 Minuten. Nach dem Versuch wurde das Herz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Während der Perfusion wurden die Kontraktionsdaten mit Hilfe des Programms „Chart 5 (PowerLab)“ aufgezeichnet. Folgende Daten wurden aufgezeichnet: Druck des linken Ventrikels (mmHg), des linken Vorhofs (mmHg) und der Aorta (mmHg) sowie Frequenz (Schläge/Minute) und 1. Ableitung des links-ventrikulären Drucks (mmHg/s). Aus den Druckkurven des linken Ventrikels wurden Einzelkontraktionen hinsichtlich der Relaxationszeit (Tf10-90, Tf20-90 und Tf50-90, siehe Abbildung 5) ausgewertet.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Relaxationszeit. Tf10-90, Tf20-90 und Tf50-90 sind die Zeit von 10, 20 bzw. 50 % bis 90 % Relaxation.**

### 3.5.6. Präparation von Herzmuskelzellen aus adulten Mauserzen

Herzmuskelzellen wurden aus Herzen von drei Monate alten Mäusen nach der Methode von Pönicke et al., 2000 und 2006 präpariert. Nach Narkose mit 50 - 75 mg/kg Körpergewicht Pento-Barbital i.p. und 500 U Heparin i.p. wurde der Brustraum geöffnet, ein Faden um den Aortenbogen gelegt, locker verknotet und mit einer Klemme fixiert. Die untere Aorta thoracica wurde durchgeschnitten und das Herz vorsichtig herausgeschnitten sowie der Aortenbogen in Höhe der Arteria carotis communis sinistra durchtrennt. Das Herz wurde in eiskalte physiologische NaCl-Lösung gelegt und in einer kleinen Schale mit begaster NaCl-Lösung kanüliert. Das Herz wurde an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen und 5 Minuten mit Lösung B perfundiert. Es folgten 5 Minuten Perfusion mit Lösung A mit 0,1 % fettsäure-freiem BSA. Es wurde auf rezirkulierende Perfusion mit Lösung C1 umgeschaltet. Nach 5 Minuten wurde durch Zugabe einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 0,025 mM, nach 10 Minuten auf 0,05 mM und nach 15 Minuten auf 0,1 mM erhöht. Die Perfusionsflüssigkeit wurde unter dem Mikroskop auf Herzmuskelzellen überprüft. Das Herz wurde aus der Apparatur genommen und auf einem Uhrglas der rechte Ventrikel abgeschnitten. Der linke Ventrikel wurde mit zwei Skalpellmessern zerschnitten und in Perfusionslösung in einem Becherglas überführt und im Wasserbad bei 37 °C begast und inkubiert. Nach zwei Minuten wurden Gewebestückchen mit einer sterilen Pipette aufgesaugt und langsam wieder auslaufen gelassen. Dieser Vorgang wurde bis 10 Minuten wiederholt. Danach wurde die Suspension in 25 ml-Röhrchen überführt, für 2 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspendieren des Sediments mit Lösung

D wurde die Suspension nochmals zentrifugiert und der Überstand abgenommen und das Sediment in Lösung D aufgenommen. Nach Filtration durch einen Nylonfilter wurden die Zellen langsam sedimentieren gelassen, der Überstand vorsichtig abgenommen und in Lösung D resuspendiert, nochmals langsam sedimentieren gelassen, der Überstand abgenommen und das Sediment in Medium M199 mit 10 % (v/v) neugeborenes Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die Zellzahl und die Anzahl von Stäbchen-förmigen und abgerundeten Zellen wurde in einer Sedgewick-Rafter-Zählkammer bestimmt. Für Versuche wurden nur Zellpräparationen benutzt bei denen der Anteil Stäbchen-förmiger Zellen über 70 % der gesamten Zellen betrug. Herzmuskelzellen wurden auf 100.000 Zellen/ml in Medium M199 mit 10 % (v/v) neugeborenes Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (alles von Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung in einem Inkubator mit Wasser-gesättigter Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert.

### **3.5.7. Versuche mit isolierten Herzmuskelzellen**

#### **3.5.7.1. Markierung von Zellen mit [<sup>32</sup>P]-Phosphorsäure**

Herzmuskelzellen wurden in Lösung C aufgenommen (100.000 Zellen/ml) und auf einem Heizblock 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung C wurde abgenommen und durch Lösung C mit 0,5 mCi [<sup>32</sup>P]-Phosphorsäure ersetzt. Die Zellen wurden vorsichtig geschwenkt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und Applikationslösung und Adenosindeaminase zu den Zellen gegeben, wodurch eine Konzentration von 1,7 mg/ml erreicht wurde, geschwenkt und 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden aufgeteilt und weiter behandelt.

#### **3.5.7.2. $\beta$ -adrenerge Stimulierung von Zellen mit Isoprenalin**

Herzmuskelzellen wurden wie in 3.5.7.1 beschrieben markiert. Die Zellen wurden in Aliquots aufgeteilt und mit 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> mol/l Isoprenalin oder mit Kontrolllösung 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Ladepuffer für SDS-Page mit SDS und DTT abgestoppt, das Zelllysat gemischt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Proben wurden 10 Minuten bei 95 °C hitzedenaturiert und auf ein 12%iges Porzio-Trenngel mit 4%igem Sammelgel aufgetragen, bei 50 mA elektrophoretisch getrennt, die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet, in einer PhosphorImager-Kassette exponiert und die Kassette mit dem STORM 860 ausgelesen. Die TnI-Phosphorylierung (Bande bei etwa 30 kDa) sowie die Phospholamban-Phosphorylierung (Bande bei etwa 6 kDa) wurde mit der ImageQuant®-Software ausgewertet. Durch einen Abgleich auf eine Bande mit konstanter Phosphorylierung konnten verschiedene Gele verglichen werden bzw. Beladungsunterschiede der Proben ausgeglichen werden.

Um die Phosphorylierung von Phospholamban an Ser<sup>16</sup> zu untersuchen wurden Zellen, wie im Abschnitt oben beschrieben, ohne [<sup>32</sup>P]-Phosphorsäure behandelt. Der Phosphorylierungszustand des Phospholambans wurde mittels Westernblot untersucht. Der immunologische Nachweis von CSQ diente hier als Beladungskontrolle.

### **3.6. Menschliche Proben**

Patientenproben aus dem rechten Vorhof stammten aus dem Universitätsklinikum Halle und wurden in Kooperation mit der Universitätsklinik für Herz und Thoraxchirurgie (Leitung: Prof. R.-E. Silber) gesammelt. Die Gewebeentnahme erfolgte im Rahmen einer Routine-Bypass-Operation. Die Patienten wurden aufgeklärt und stimmten vorher der Abgabe von Proben zu. Ventrikelgewebe stammte von Organspenden bzw. von Spenderherzen, die für eine Transplantation nicht geeignet waren (Universitätskliniken Münster und Hamburg).

### **3.7. Statistische Auswertung**

Es wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet, n ist die Anzahl der Einzelwerte. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben überprüft. p-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant (\*) angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expression rekombinanter Protein-Phosphatasen in *E. coli*

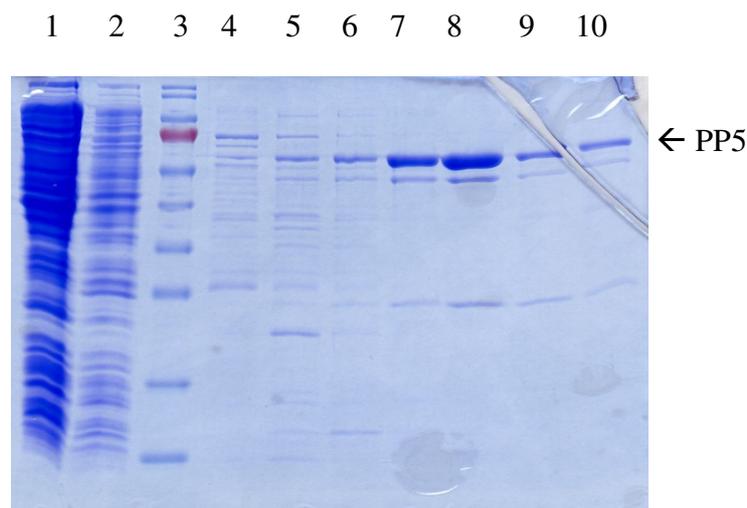
#### 4.1.1. PP5

Rekombinante PP5 wurde in *E. coli* exprimiert und mit dem Protino-Kit bzw. mittels Ni-NTA-Säule und Fast Protein Liquid Chromatografie (FPLC) aufgereinigt. Die FPLC ermöglicht eine Trennung von Proteinen aus einem komplexen Reaktionsgemisch. Durch Coomassie-Färbung von Proteingelen und Westernblots gegen PP5 und gegen den His-Tag wurde die Qualität der Präparationen analysiert. Ein His-Tag ist ein Motiv in Proteinen, welches mindestens 6 Histidin-Reste hintereinander am N- oder C-Terminus enthält.

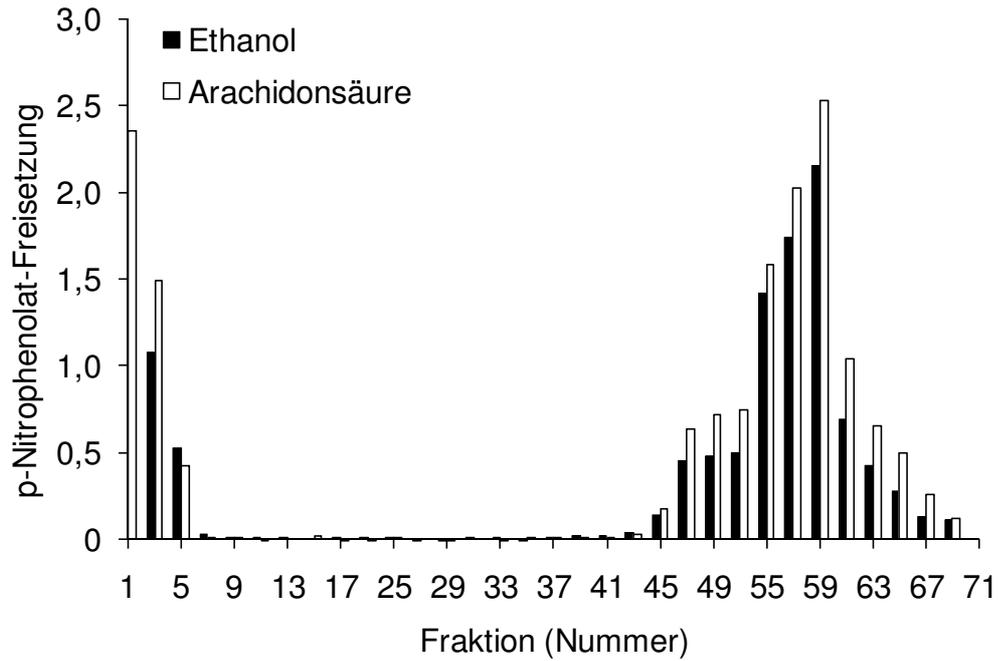
Abbildung 6 zeigt ein Coomassie-gefärbtes Gel einer FPLC-Präparation. Es wurden der Durchlauf vom Dialysepuffer, der Durchlauf vom Waschpuffer und die Fraktionen 44, 51, 54, 57, 60, 63 und 66 aufgetragen. In den Fraktionen 51, 54, 57, 60, 63 und 66 ist jeweils eine Bande bei 58 kDa (PP5) und eine Bande unter 58 kDa (mögliches proteolytisches Fragment) zu sehen. Trotz Kühlung und Zugabe von Proteasehemmstoffen während der Aufreinigung blieb eine Bande bei etwa 45 kDa nachweisbar, was auf eine eventuelle Proteolyse schon während der Expression hinweisen könnte.

Die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5-Präparation wurde im p-Nitrophenylphosphat-Assay (pNPP-Assay) untersucht. Die maximale Protein-Phosphatase-Aktivität war in den Fraktionen Nummer 55 bis 59 messbar. Die Protein-Phosphatase-Aktivität wurde nur schwach durch Arachidonsäure stimuliert (Abbildung 7).

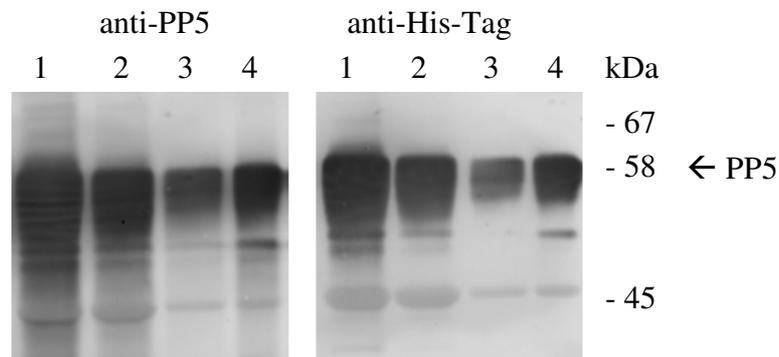
Nach der Reinigung der PP5 mit dem Protino-Kit war im Westernblot mit einem Antikörper gegen PP5 und gegen den His-Tag im 1. Eluat nach der Reinigung der PP5 mit dem Protino-Kit die PP5 bzw. der His-Tag und ein proteolytisches Fragment nachweisbar (Abbildung 8).



**Abbildung 6:** Nachweis der PP5 im Coomassie-gefärbten Gel (1: Durchlauf (Dialysepuffer), 2: Durchlauf (Waschpuffer), 3: Molekulargewichtsstandard (190, 120, 85, 60, 50, 40, 25, 20, 15 und 10 kDa), 4: Fraktion 44, 5: Fraktion 51, 6: Fraktion 54, 7: Fraktion 57, 8: Fraktion 60, 9: Fraktion 63, 10: Fraktion 66).



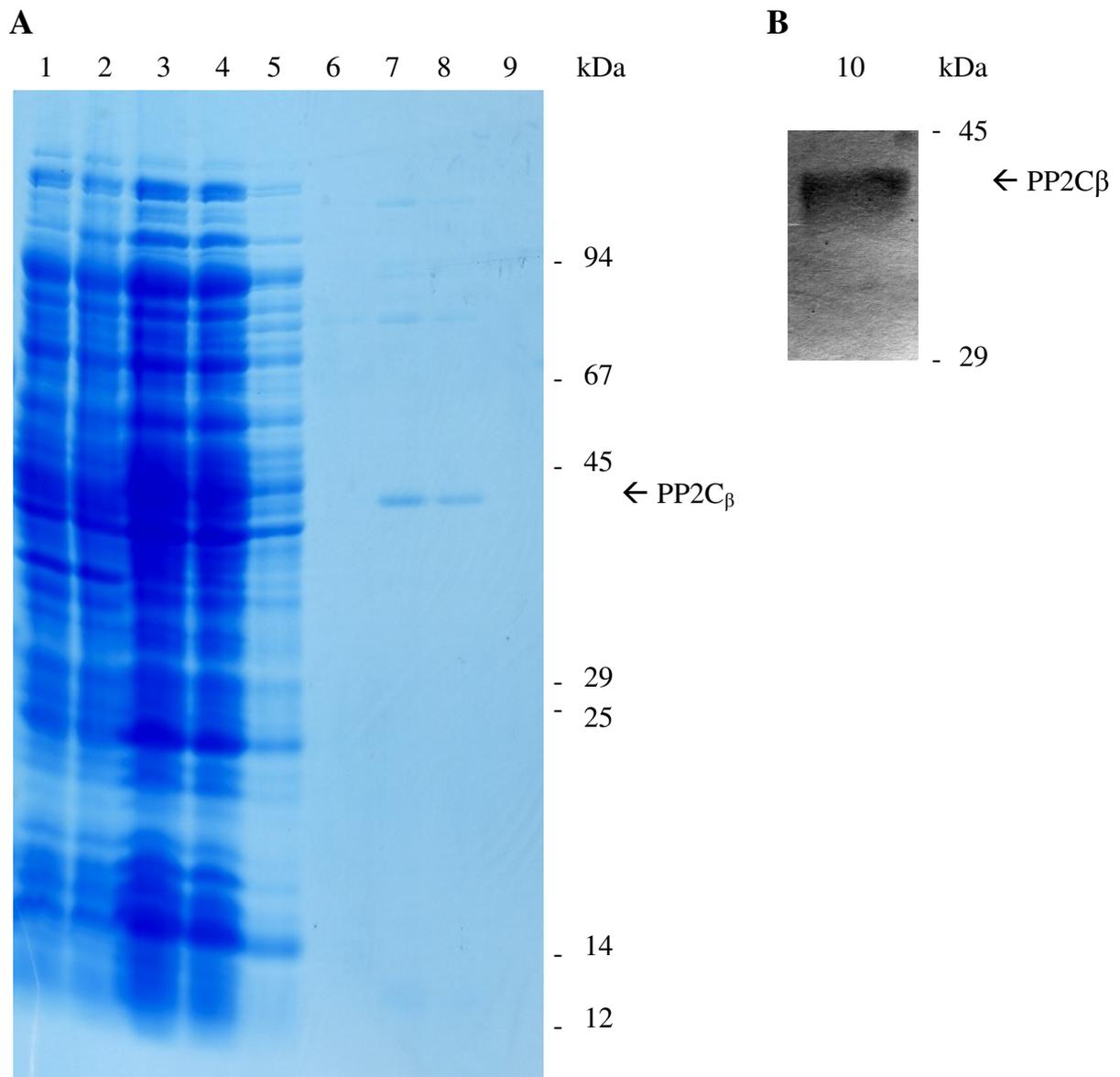
**Abbildung 7: Protein-Phosphatase-Aktivität in FPLC-Fractionen einer PP5-Aufreinigung mit pNPP als Substrat. Die Dephosphorylierung von pNPP wurde mittels Messung der p-Nitrophenolat-Freisetzung bei 405 nm bestimmt.**



**Abbildung 8: Nachweis der PP5 und des His-Tags im Westernblot (1: 1. Eluat (30 µl), 2: 2. Eluat (30 µl), 3: 3. Eluat (30 µl), 4: 1. Eluat (5 µl)).**

#### 4.1.2. PP2C $\beta$

Rekombinante PP2C $\beta$  wurde in *E. coli* exprimiert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung (Abbildung 9 A) sowie Westernblot (Abbildung 9 B) nachgewiesen. Im Coomassie-gefärbten Gel ist in der Spur des 1. Eluats (Spur 7 in Abbildung 9 A) eine Bande bei etwa 40 kDa zu sehen, diese wurde im Westernblot als PP2C $\beta$  identifiziert.



**Abbildung 9:** A: Nachweis der PP2C $\beta$  im Coomassie-gefärbten Gel (1: *E. coli*-Lysat vor Induktion mit IPTG, 2: *E. coli*-Lysat nach Induktion mit IPTG, 3: Lysozymextrakt, 4: Durchfluss durch His-Tag-Säule, 5: 1. Waschfraktion, 6: 2. Waschfraktion, 7: 1. Eluat, 8: 2. Eluat, 9: 3. Eluat, kDa: Molekulargewichtsstandard, B: Nachweis von PP2C $\beta$  (1. Eluat) im Westernblot (10: 1. Eluat, kDa: Molekulargewichtsstandard).

#### 4.2. Klonierung der PP5-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor

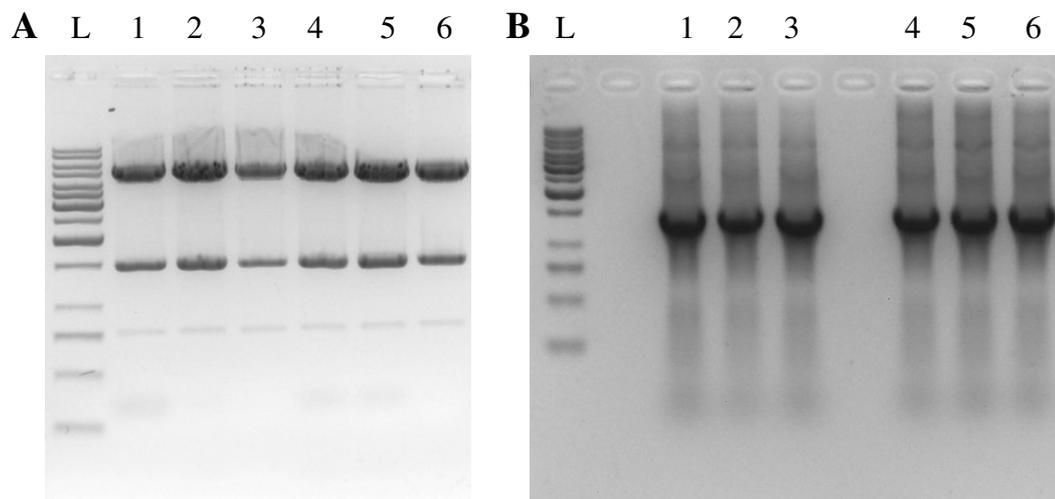
Um die cDNA der PP5 in einer eukaryotischen Zelllinie exprimieren zu können, wurde ein eukaryotischer Expressionsvektor (pcDNA 4/HisMax A, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit BamHI und EcoRI geschnitten, elektrophoretisch getrennt und das Fragment gereinigt.

Da die cDNA der PP5 im PP5-PQE-Vektor keine entsprechenden Schnittstellen enthielt, wurde die cDNA mittels PCR mit Primern, die Schnittstellen für BamHI und EcoRI enthielten, amplifiziert. Die Größe des erwarteten PCR-Produkts von etwa 1,5 kb stimmte mit den Ergebnissen überein.

Das PCR-Produkt wurde in den pJET1/blunt-Klonierungsvektor ligiert und transformiert. Es wurden Klone isoliert, amplifiziert und mittels Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI getestet.

Für einen präparativen Restriktionsverdau wurde eine größere Menge DNA von positiven Klonen nacheinander mit BamHI und EcoRI geschnitten. Alle Proben wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, die Bande bei 1,5 kb ausgeschnitten und aufgereinigt.

Die aufgereinigten Restriktionsprodukte (PP5-cDNA und pcDNA 4/HisMax A) wurden ligiert und in XL1<sub>blue</sub> kompetente Zellen transformiert. Es wurden Klone isoliert, amplifiziert und mittels Restriktionsverdau überprüft (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Überprüfung der pcDNA/HisMax-PP5 A-Klone mittels A: Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI und B: mittels PCR (L: 1 kb-DNA-Leiter (10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 1,5, 1, 0,75, 0,5 und 0,25 kb), 1: Klon Nr 1, 2: Klon Nr 2, 3: Klon Nr 3, 4: Klon Nr 4, 5: Klon Nr 5, 6: Klon Nr 6).**

Die erwarteten Fragmente waren 5235 bp (Vektor) und 1492 bp (PP5) groß. Alle Klone waren positiv. Die Sequenz des Klons Nr 1 wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Es wurden keine Mutationen nachgewiesen.

Abbildung 11 zeigt eine Plasmidkarte des pcDNA/HisMaxA-PP5-Plasmids.

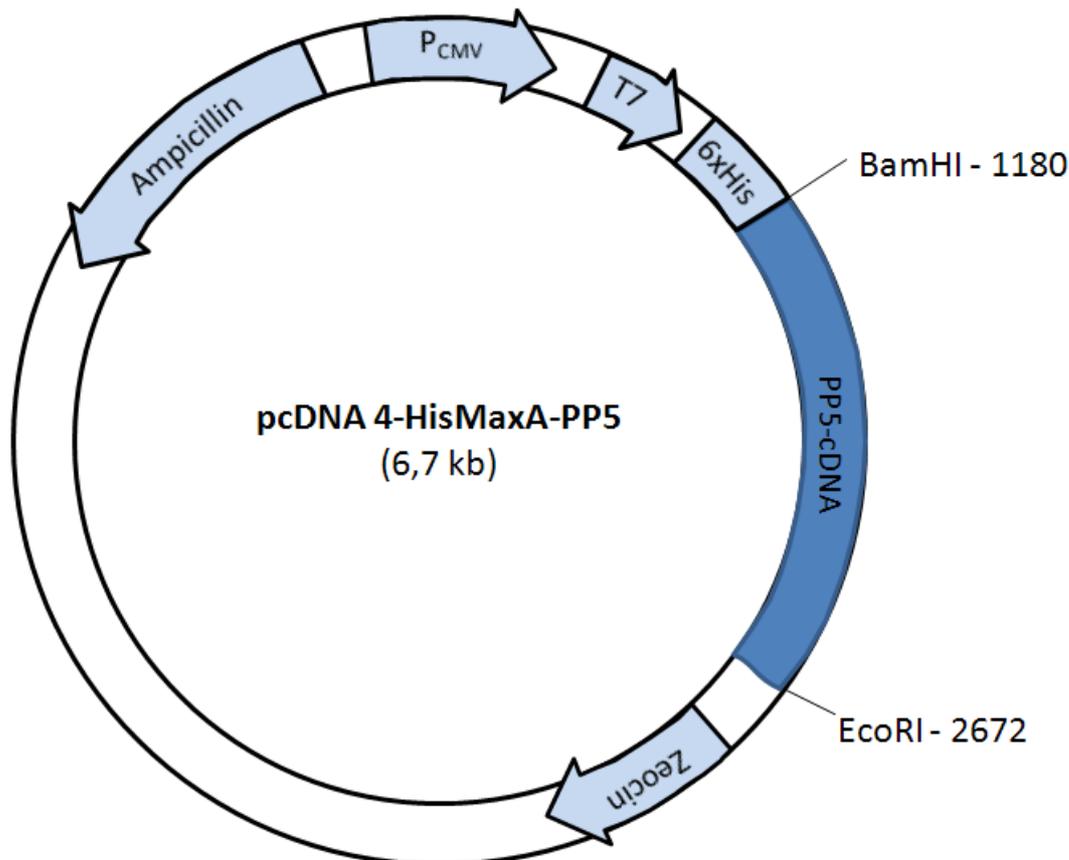


Abbildung 11: Plasmidkarte des pcDNA/HisMaxA-PP5-Plasmids.

#### 4.3. Klonierung der PP2C<sub>β</sub>-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor

Für die Generierung einer transgenen Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression der PP2C<sub>β</sub> wurde die cDNA der PP2C<sub>β</sub> mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt entsprach der erwarteten Größe von etwa 1,2 kb. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den pJET1/blunt-Klonierungsvektor kloniert.

Für eine Klonierung in den p $\alpha$ MHC-Vektor wurden die Plasmide pJET1-PP2C<sub>β</sub> und p $\alpha$ MHC mit Eco52I und KpnI geschnitten. Die Produkte wurden miteinander ligiert und in kompetente *E. coli* XL1<sub>blue</sub>-Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA-enhaltenden Klone wurden mittels Doppelverdau mit Eco52I und KpnI getestet. Das p $\alpha$ MHC-PP2C<sub>β</sub>-Plasmid eines positiven Klones wurde mittels Qiagen EndoFree-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) für die Injektion in Oozyten von Mäusen gereinigt. Die Identität des Plasmids wurde mittels Doppelverdau mit Eco52I und KpnI sowie mittels Verdau mit NruI elektrophoretisch überprüft (Abbildung 12). Das mit NruI geschnittene Plasmid stand für die Injektion in Mausoozyten zur Verfügung.

Abbildung 13 zeigt eine Plasmidkarte des p $\alpha$ MHC-PP2C<sub>β</sub>-Plasmids.

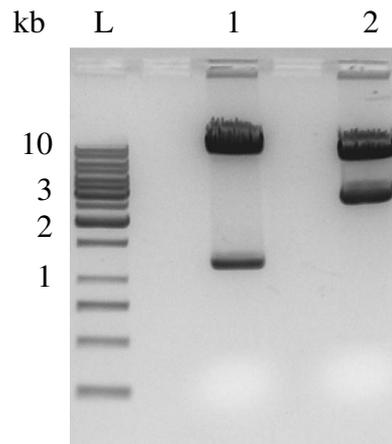


Abbildung 12: Restriktionsverdau der gereinigten p $\alpha$ MHC-PP2C $\beta$ -Plasmid-DNA mit 1: Eco52I und KpnI bzw. bei 2: mit NruI, L: 1 kb-DNA-Leiter (10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 1,5, 1, 0,75, 0,5 und 0,25 kb).

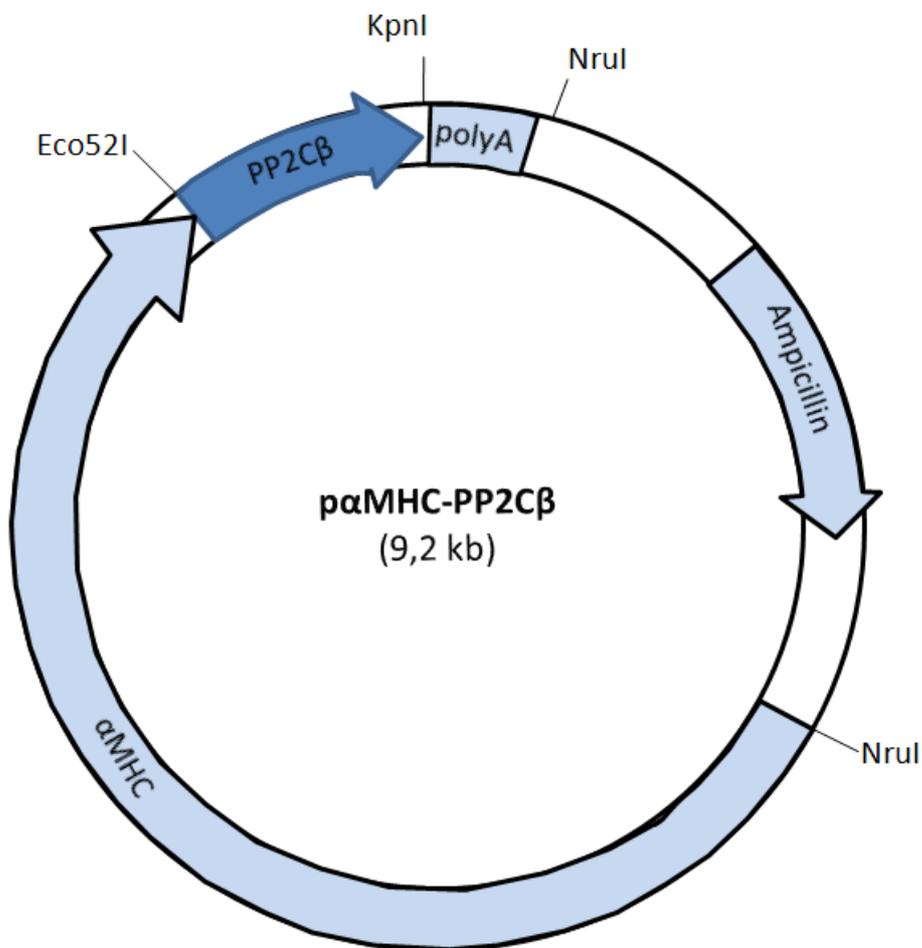
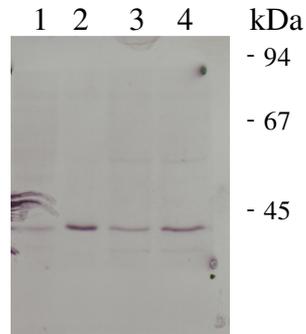


Abbildung 13: Plasmidkarte des p $\alpha$ MHC-PP2C $\beta$ -Plasmids.

#### 4.3.1. PP2C $\beta$ -Proteinexpression in verschiedenen Organen

PP2C $\beta$  konnte mittels Westernblot in der Leber und in Herzmuskelzellen der Maus nachgewiesen werden. Leberproben wurden gewählt, da PP2C $\beta$  bekanntermaßen in der Leber exprimiert wird (Ohnishi et al., 1999).



**Abbildung 14: PP2C $\beta$ -Nachweis in Proben von Maus und Ratte (100  $\mu$ g Protein/Spur, 1: Rattenleber, 2: Maus-Herzmuskelzellen, 3 und 4: Mausleber).**

## 4.4. Protein-Phosphatase-Aktivitäten

### 4.4.1. PP5

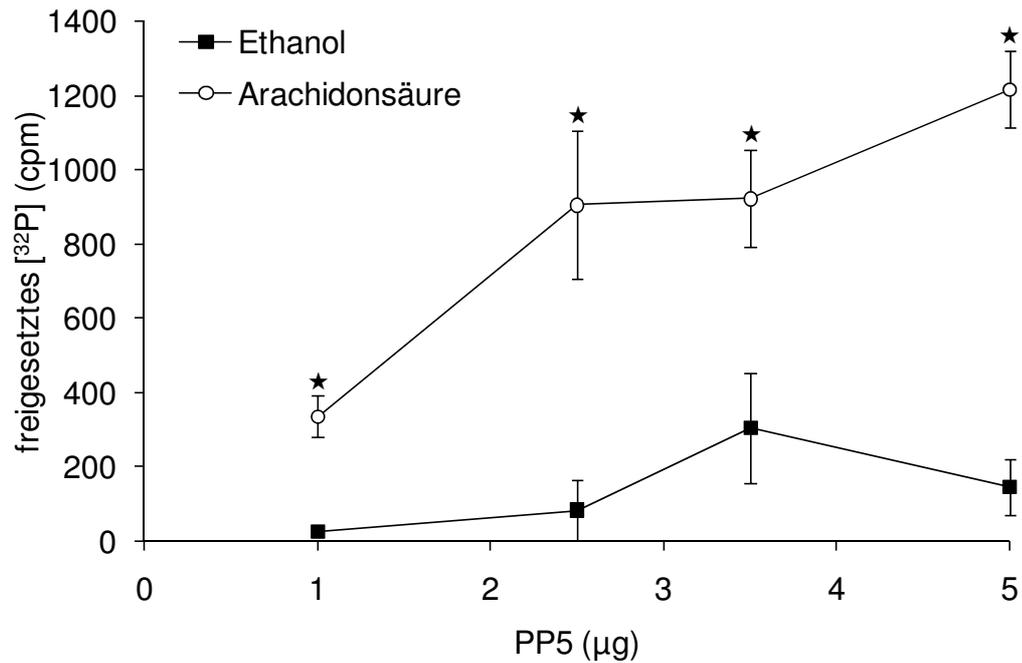
#### 4.4.1.1. Dephosphorylierung von [<sup>32</sup>P]-Casein

Die Protein-Phosphatase-Aktivität rekombinanter PP5 wurde mit [<sup>32</sup>P]-Casein als Substrat untersucht. In jedem Versuch wurden unspezifische und Gesamtaktivität der Ansätze mit bestimmt, nur wenn die unspezifische Aktivität weniger als 10 % der Gesamtaktivität betrug, wurden die Versuche ausgewertet. In einer Proteinabhängigkeit wurden 1 bis 5 µg PP5 in ihrer Aktivität gegenüber [<sup>32</sup>P]-Casein unter unstimulierten Bedingungen (Ethanol, Lösungsmittelkontrolle) und nach Stimulierung durch 200 µM Arachidonsäure untersucht. Die Protein-Phosphatase-Aktivität von PP5 war in Anwesenheit von Arachidonsäure gegenüber unstimulierten Bedingungen erhöht (Abbildung 15).

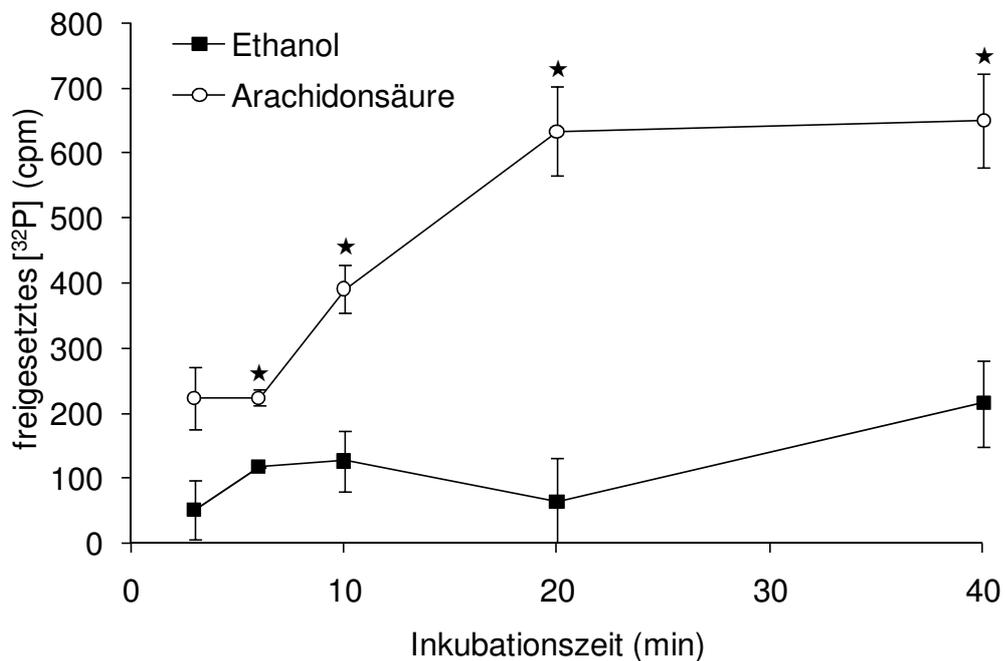
Außerdem wurde eine Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung von [<sup>32</sup>P]-Casein (3 bis 40 Minuten) bestimmt (Abbildung 16). Die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 stieg unter Arachidonsäure-Stimulierung bis etwa 20 Minuten an und erreichte dann ein Plateau. Unter unstimulierten Bedingungen konnte nur ein geringer Anstieg der PP5-Aktivität gemessen werden.

NaF ist ein Hemmstoff der Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen. Es wurde die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 gegenüber [<sup>32</sup>P]-Casein als Substrat in Anwesenheit von NaF bzw. unter Bedingungen ohne NaF untersucht (60 Minuten Inkubation). Die Protein-Phosphatase-Aktivität der rekombinanten PP5 war in Gegenwart von 50 mM NaF nicht mehr durch Arachidonsäure stimulierbar und entsprach der unstimulierten PP5 (Abbildung 17).

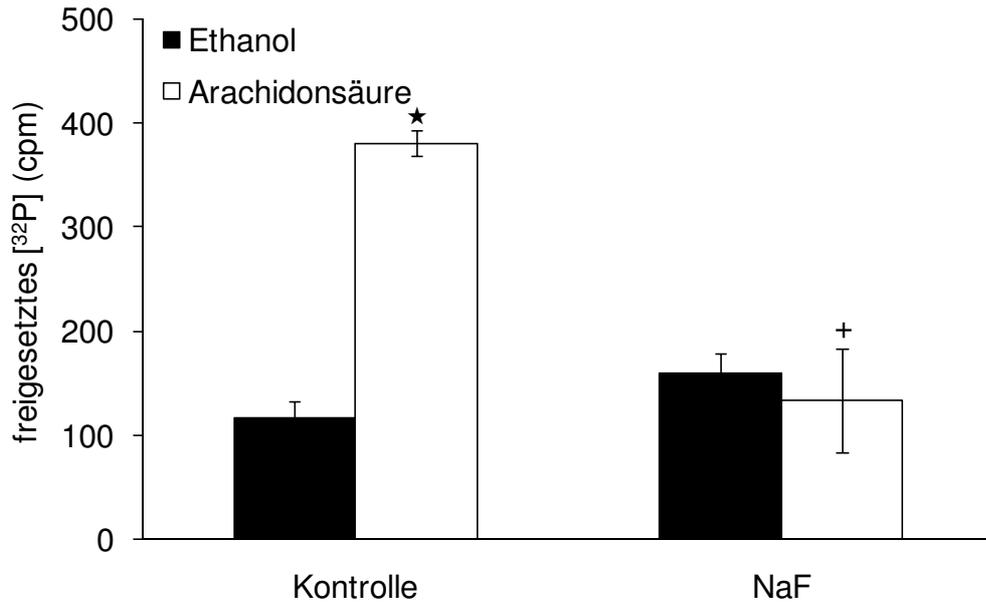
Ein weiterer Hemmstoff der Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen ist Cantharidin, Cantharidin hemmt die Arachidonsäure-stimulierbare Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 50 nM (Borthwick et al., 2001). Hier wurde ein Versuch mit 10<sup>-4</sup> M Cantharidin durchgeführt. Cantharidin hemmte PP5, wenn diese mit Arachidonsäure behandelt worden war um 55 % (Abbildung 18).



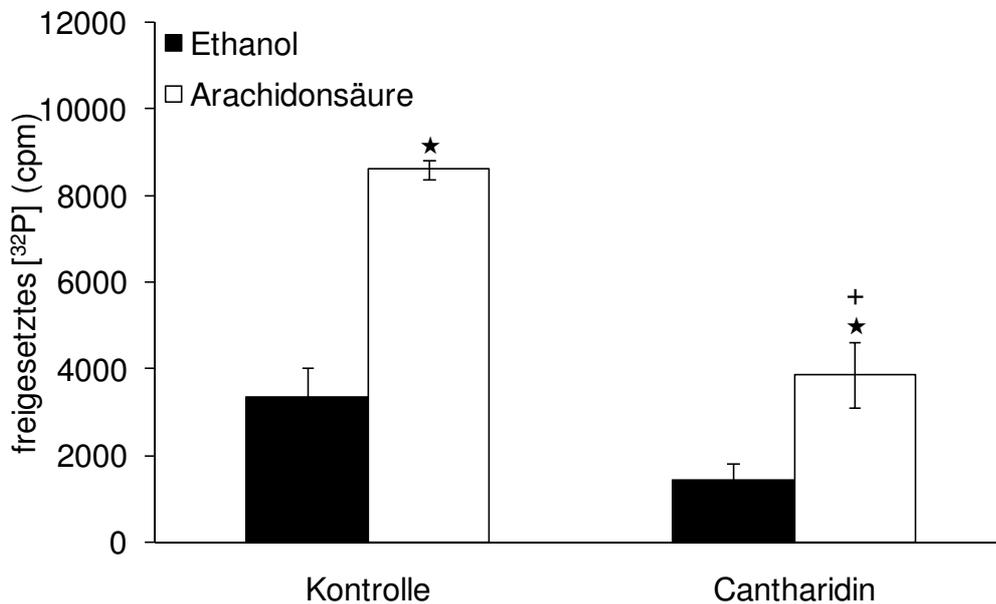
**Abbildung 15: Proteinabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität von PP5 gegenüber  $[^{32}\text{P}]$ -Casein als Substrat im Vergleich zwischen Stimulierung mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure und unstimulierte Bedingung (Ethanol,  $\star p < 0,05$  vs. Ethanol,  $n = 3$ ).**



**Abbildung 16: Zeitabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität von PP5 gegenüber  $[^{32}\text{P}]$ -Casein als Substrat im Vergleich zwischen Stimulierung mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure und unstimulierte Bedingung (Ethanol,  $\star p < 0,05$  vs. Ethanol,  $n = 3$ ).**



**Abbildung 17: Hemmung der Protein-Phosphatase-Aktivität von PP5 gegenüber  $[^{32}\text{P}]$ -Casein durch NaF (50 mM) im Vergleich zwischen Stimulierung mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure und unstimulierte Bedingung (Ethanol,  $\star p < 0,05$  vs. Ethanol,  $^+ p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 3$ ).**

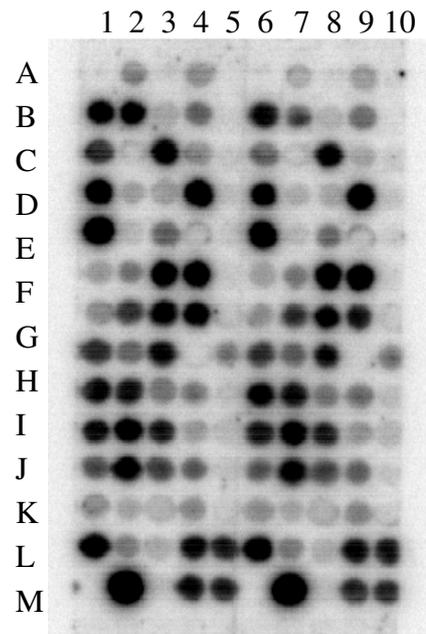


**Abbildung 18: Hemmung der Protein-Phosphatase-Aktivität von PP5 gegenüber  $[^{32}\text{P}]$ -Casein durch  $10^{-4}$  M Cantharidin im Vergleich zwischen Stimulierung mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure und unstimulierte Bedingung (Ethanol,  $\star p < 0,05$  vs. Ethanol,  $^+ p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 3$ ).**

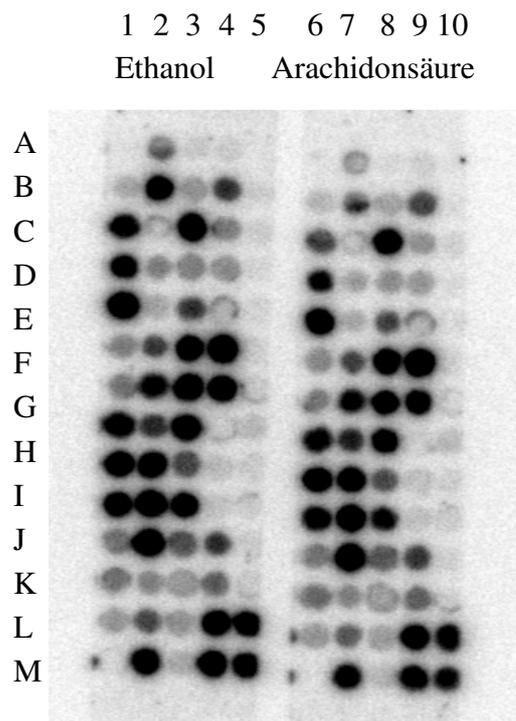
#### 4.4.1.2. Dephosphorylierung membrangebundener Phosphopeptide

Um potentielle Substrate der PP5 zu finden, wurden Peptide, die aus der Literatur bekannte PKA-Phosphorylierungsstellen enthielten, auf Zellulosemembranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP und PKA phosphoryliert und danach mit unstimulierter (Ethanol) bzw. stimulierter (200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure) rekombinanter PP5 behandelt. Es wurde die Phosphorylierung der Peptide im Vergleich von PP5 mit Arachidonsäure und PP5 mit Ethanol untersucht, als Ausgangslage diente die Phosphorylierung vor dem Versuch. Die Peptide wurden durch Datenbanksuche ermittelt (siehe 8.11). Abbildung 19 zeigt die Membran nach der radioaktiven Markierung und vor der Behandlung mit PP5, Abbildung 20 zeigt die Membran nach Behandlung mit PP5 mit Arachidonsäure bzw nach Kontrollbehandlung.

Die Auswertung ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Dephosphoryliert wurden cGMP-gehemmte Phosphodiesterase PDE3B (PDE3B, Ser10), Phospholamban (PLB, Ser16), cAMP-responsives Element Modulator (CREMt, Ser113), Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1, Ser1248), Kv4.2- $\alpha$ -Untereinheit des *Shal*-Typ  $\text{K}^+$ -Kanals (Kv4.2, Ser552), Elongationsfaktor 2 Kinase (EF-2-Kinase, Ser499),  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor ( $\text{B}_2\text{AR}$ , Ser345/Ser346/Ser261/Ser262), Kir2.3  $\text{K}^+$ -Kanal (Kir2.3, Ser443), regulatorische (inhibitorische) Untereinheit 9B der PP1 (PPP1R9B, Ser94), Myosin-bindendes Protein C (Herzisoform, MBC-C, Ser282/Ser302/Ser273), Troponin-Inhibitor (Herzmuskel, TnI, Ser23/Ser24),  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ 1-Untereinheit (Na-K-H1 $_{\alpha}$  (Herz), Ser528), Bcl-2-Antagonist des Zelltodes (BAD, Ser155), cAMP responsives Element-Bindingsprotein (CREB, Ser133),  $\text{Na}^+\text{H}^+$ -Austauscher 3 (NHE3, Ser540), Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2, Ser2808), Phospholemman (PLM, Ser88), Human Ether-A-Go-Go Related Gen /  $\text{K}^+$ -Ionen-Transportkanal (hERG, Ser1140/Ser285), Inositol 1,4,5-Triphosphat Typ I Rezeptor (IP3R, Ser1588/Ser1755), cAMP-abhängige Proteinkinase regulatorische Untereinheit Typ II $_{\alpha}$  (PKA-RII $_{\alpha}$ , Ser96), Dihydropyridin-sensitiver L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (Skelettmuskel, CICC, Ser687/Ser1502), Phospholipase C- $\beta$ 3 (PLC- $\beta$ 3, Ser1105) und Kir6.2-Untereinheit des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals (Kir6.2, Ser372). Diese Proteine könnten potentielle Substrate der PP5 darstellen. Einige Peptide konnten nicht ausgewertet werden, da sie von der PKA nicht phosphoryliert wurden (Tabelle 1).



**Abbildung 19:** Typische Autoradiografie der Peptidmembran nach radioaktiver Markierung (Phosphorylierung) mit  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und PKA.



**Abbildung 20:** Typische Autoradiografie der Peptidmembran nach Behandlung mit PP5 in Gegenwart von Ethanol (Kontrolle) bzw.  $200\ \mu\text{M}$  Arachidonsäure.

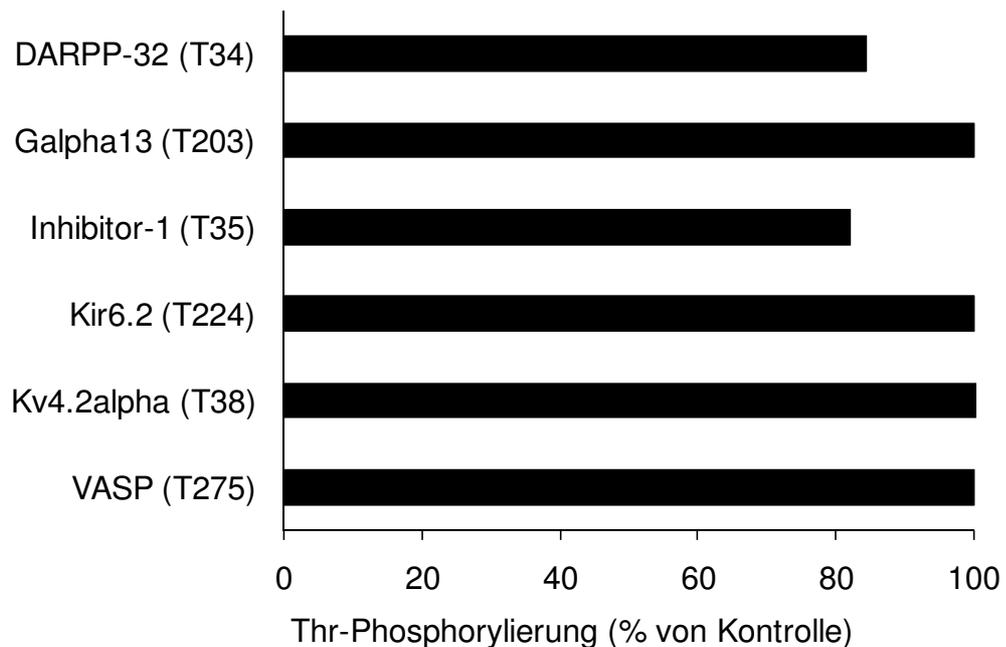
**Tabelle 1: Auswertung der Dephosphorylierungsversuche der Peptidmembranen mit PP5 (n = 3).**

<b>Peptid (vgl. auch 8.11):</b>	<b>Position auf Membran</b>	<b>potentielles Substrat (wenn in allen Versuchen dephosphoryliert)</b>	<b>% Dephosphorylierung <math>\pm</math> SEM</b>
PDE3B S10	J1/J6	potentielles Substrat	24 $\pm$ 3
PLB S16	J3/J8, N5/N10, M5/M10	potentielles Substrat	21 $\pm$ 3
CREMt S113	B2/B7	potentielles Substrat	21 $\pm$ 4
PLC- $\gamma$ 1 S1248	L3/L8	potentielles Substrat	20 $\pm$ 9
Kv4.2 S552	B3/B8	potentielles Substrat	17 $\pm$ 12
EF-2-Kinase S499	D2/D7	potentielles Substrat	16 $\pm$ 9
B <sub>2</sub> AR S345	F1/F6	potentielles Substrat	16 $\pm$ 7
Kir2.3 S443	M2/M7	potentielles Substrat	15 $\pm$ 6
PPP1R9B S94	M3/M8	potentielles Substrat	14 $\pm$ 3
MBP-C S282	D3/D8	potentielles Substrat	13 $\pm$ 4
TnI S23	M4/M9	potentielles Substrat	11 $\pm$ 2
B2AR S346	G1/G6	potentielles Substrat	11 $\pm$ 5
TnI S24	N4/N9	potentielles Substrat	11 $\pm$ 2
Na-K-H1 $_{\alpha}$ (Herz) S528	L4/L9	potentielles Substrat	9 $\pm$ 5
BAD S155	C1/C6	potentielles Substrat	9 $\pm$ 1
CREB S133	A2/7	potentielles Substrat	8 $\pm$ 5
NHE3 S540	G3/G8	potentielles Substrat	8 $\pm$ 2
Kir2.1 S426	L2/L7	-	8 $\pm$ 9
RyR2 S2808	B4/B9	potentielles Substrat	7 $\pm$ 4
MBC-C S302	E3/E8	potentielles Substrat	6 $\pm$ 2
PLM S88	I3/I8	potentielles Substrat	6 $\pm$ 1
hERG S1140	I2/I7	potentielles Substrat	6 $\pm$ 2
IP3R S1588	J2/J7	potentielles Substrat	5 $\pm$ 1
Glykogen PP1 S44	F2/F7	-	5 $\pm$ 5
PKA-RII $_{\alpha}$ S96	H1/H6	potentielles Substrat	4 $\pm$ 0,2
B <sub>2</sub> AR S261	D1/D6	potentielles Substrat	4 $\pm$ 1
hERG S285	H2/H7	potentielles Substrat	4 $\pm$ 1
MBP-C S273	C3/C8	potentielles Substrat	4 $\pm$ 1
CICC S687	K1/K6	potentielles Substrat	4 $\pm$ 3
PLC- $\beta$ 3 S1105	K3/K8	potentielles Substrat	3 $\pm$ 1
Glykogen PP1 S67	G2/G7	-	3 $\pm$ 2

IP3R S1755	K2/K7	potentielles Substrat	3 ± 1
B <sub>2</sub> AR S262	E1/E6	potentielles Substrat	2 ± 2
LTCC-a1 S1897	G4/G9	-	2 ± 2
CICC S1502	D4/D9	potentielles Substrat	2 ± 1
Na-K-H1 <sub>α</sub> S943	F3/F8	-	2 ± 2
PDE4D3 S129	I1/I6	-	1 ± 1
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz) S525	K4/K9	-	1 ± 1
LTCC-a1 S1889	F4/F9	-	1 ± 1
Kir6.2 S372	N2/N7	potentielles Substrat	1 ± 0,4
LTCC-a1 S1597	M1/M6	-	1 ± 1
CICC S1392	L1/L6	-	0
LTCC-a1 S1487	C4/C9	-	0
NHE3 S593	H3/H8	-	0
AKAP95 S325	A1/6	nicht phosphorylierbar	-
ANP S104	B1/B6	nicht phosphorylierbar	-
CICC S1575	N1/N6	nicht phosphorylierbar	-
Connexin 43 S364	I5/I10	nicht phosphorylierbar	-
Connexin 43 S365	J5/J10	nicht phosphorylierbar	-
Connexin 43 S369	K5/K10	nicht phosphorylierbar	-
Connexin 43 S373	L5/L10	nicht phosphorylierbar	-
CREP S44	C2/C7	nicht phosphorylierbar	-
Fos S362	E2/E7	nicht phosphorylierbar	-
Kv1.1 <sub>α</sub> S446	A3/8	nicht phosphorylierbar	-
LTCC-a1 S1670	E4/E9	nicht phosphorylierbar	-
LTCC-β2a S510	H4/H9	nicht phosphorylierbar	-
LTCC-β2a S529	I4/I9	nicht phosphorylierbar	-
LTCC-β2a S530	J4/J9	nicht phosphorylierbar	-
PPP1R9B S100	N3/N8	nicht phosphorylierbar	-
RyR2 S2030	A4/9	nicht phosphorylierbar	-
TnI S151	A5/10	nicht phosphorylierbar	-
VASP S153	B5/B10	nicht phosphorylierbar	-
VASP S235	C5/C10	nicht phosphorylierbar	-
Vimentin S25	E5/E10	nicht phosphorylierbar	-
Vimentin S47	F5/F10	nicht phosphorylierbar	-
Vimentin S51	G5/G10	nicht phosphorylierbar	-
Vimentin S7	D5/D10	nicht phosphorylierbar	-
Yotiao S43	H5/H10	nicht phosphorylierbar	-

#### 4.4.1.3. Dephosphorylierung Thr-phosphorylierter membrangebundener Peptide

Da Peptide auf der Peptidmembran, die an Threonin phosphoryliert werden sollten, schlecht radioaktiv markiert wurden, wurden die Versuche mit synthetisch hergestellten an Threonin-phosphorylierten Peptiden durchgeführt. Der Nachweis der Phosphorylierung an Threonin erfolgte mittels Westernblot (Abbildung 21). Dephosphoriert wurden DARPP-32 Thr34 und Inhibitor-1 Thr35 von Arachidonsäure-stimulierter rekombinanter PP5.



**Abbildung 21: Dephosphorylierung von Thr-phosphorylierten membrangebundenen Phosphopeptiden durch PP5. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben (Kontrollen waren Ansätze ohne PP5 mit Arachidonsäure bzw. mit PP5 ohne Arachidonsäure, n = 2, Mittelwerte).**

#### 4.4.1.4. Dephosphorylierung von Thr17-phosphoryliertem Phospholamban

Da Phospholamban *in vivo* an Threonin-17 phosphoryliert werden kann und nicht bekannt ist, ob PP5 dieses dephosphorylieren kann, wurde die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 gegenüber Thr17-phosphoryliertem Phospholamban-Peptid untersucht. Rekombinante PP5 dephosphorylierte in Anwesenheit von Arachidonsäure Thr17-phosphoryliertes Phospholamban-Peptid (Abbildung 22) im Vergleich zur Kontroll-Bedingung (Ethanol). Als Positiv-Kontrolle wurde ein Versuch mit PP2C $\beta$  durchgeführt, da PP2C Phospholamban an Thr17 dephosphorylieren kann (MacDougall et al., 1991). PP2C $\beta$  dephosphorylierte das Peptid nur in Anwesenheit von 0,7 mM Magnesiumacetat (ohne Abbildung).

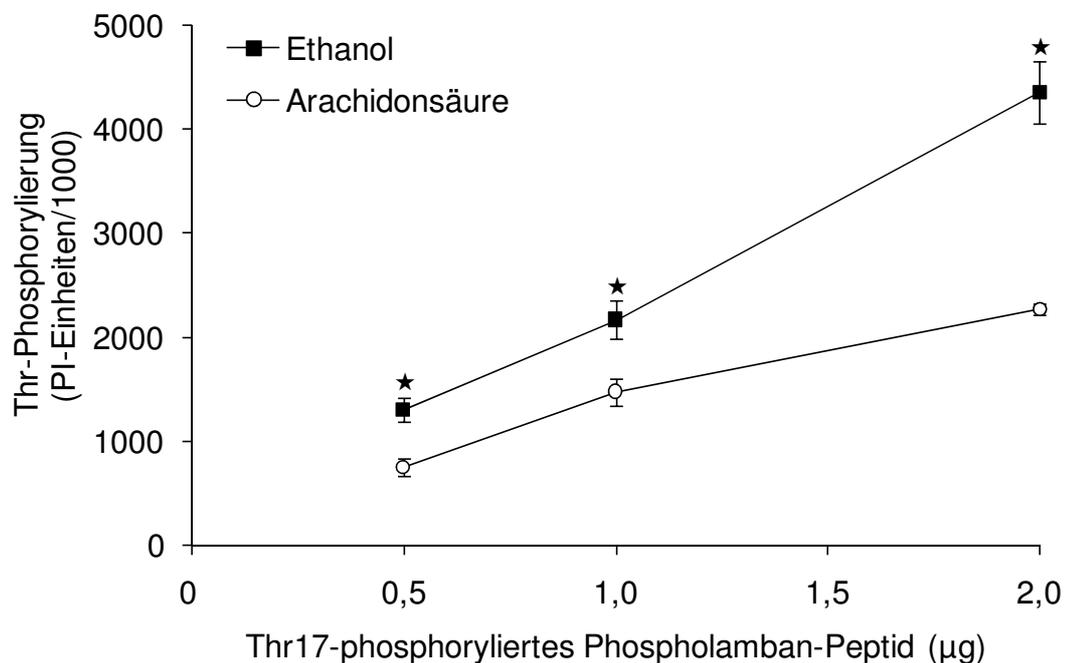
**A**

$\mu\text{g}$ Peptid	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0
Arachidonsäure	-	200 $\mu\text{M}$	-	200 $\mu\text{M}$	-	200 $\mu\text{M}$



Thr-Phosphorylierung (Dotblot)

**B**

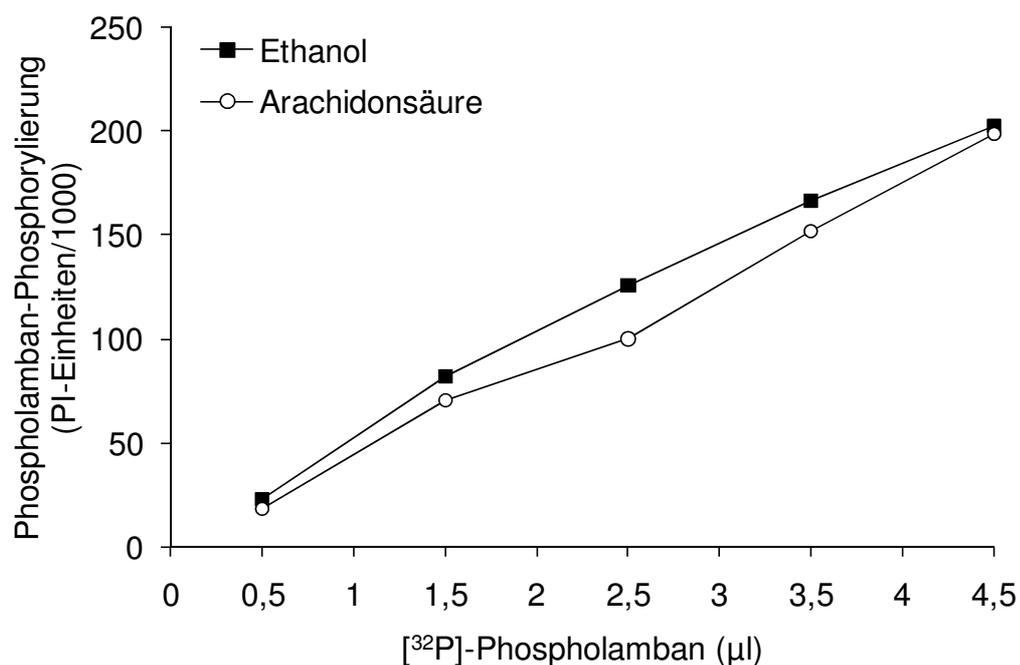


**Abbildung 22:** A: Dotblot zum Nachweis der Thr-Phosphorylierung im Thr17-phosphoryliertem PLB-Peptid nach Inkubation mit PP5 unter Kontroll-Bedingung (Ethanol) bzw. nach Stimulierung durch Arachidonsäure (Detektion mittels Westernblot), B: Substratabhängigkeit der Dephosphorylierung von Thr17-phosphoryliertem PLB-Peptid durch PP5 (2,5  $\mu\text{g}$ ) unter Kontrollbedingung und nach Stimulierung mit Arachidonsäure (PI-Einheiten: PhosphorImager-Einheiten,  $\star$   $p < 0,05$  vs. Arachidonsäure,  $n = 3$ ).

#### 4.4.1.5. Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-Phospholamban

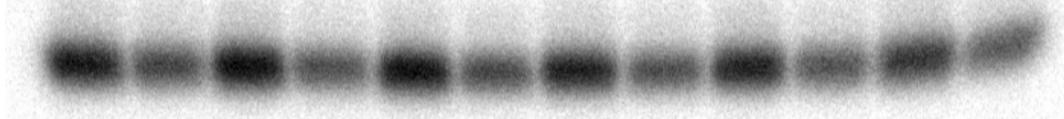
Abbildung 23 zeigt eine Substratabhängigkeit der Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-markiertem PLB mit unstimulierter und stimulierter PP5. Bei der Markierung von PLB mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP und PKA wird PLB hauptsächlich an Ser16 phosphoryliert. Zunächst wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die rekombinante PP5 entweder unstimuliert (Ethanol) oder stimuliert (Arachidonsäure) eingesetzt wurde (Abbildung 23). Hier konnte keine bzw. kaum Arachidonsäure-stimulierbare Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-PLB gemessen werden. Es wurde die Phosphorylierung von PLB bestimmt. In einem anderen Versuchsansatz enthielten alle Ansätze 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure. Die Kontrollen waren in diesen Fall Ansätze ohne PP5. Es konnte eine Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-PLB durch PP5 nachgewiesen werden (Abbildung 24 und Abbildung 25).

Abbildung 25 zeigt die graphische Auswertung der in Abbildung 24 dargestellten Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-markiertem rekombinatem PLB durch mit Arachidonsäure stimulierte PP5. Im Ansatz mit stimulierter PP5 ist weniger PLB phosphoryliert als im Kontrollansatz, was für eine Dephosphorylierung von PLB (an Ser16) durch PP5 sprechen könnte. Allerdings zeigen die Ergebnisse in Abbildung 23, dass PLB ein schwaches oder kein Substrat der PP5 ist.

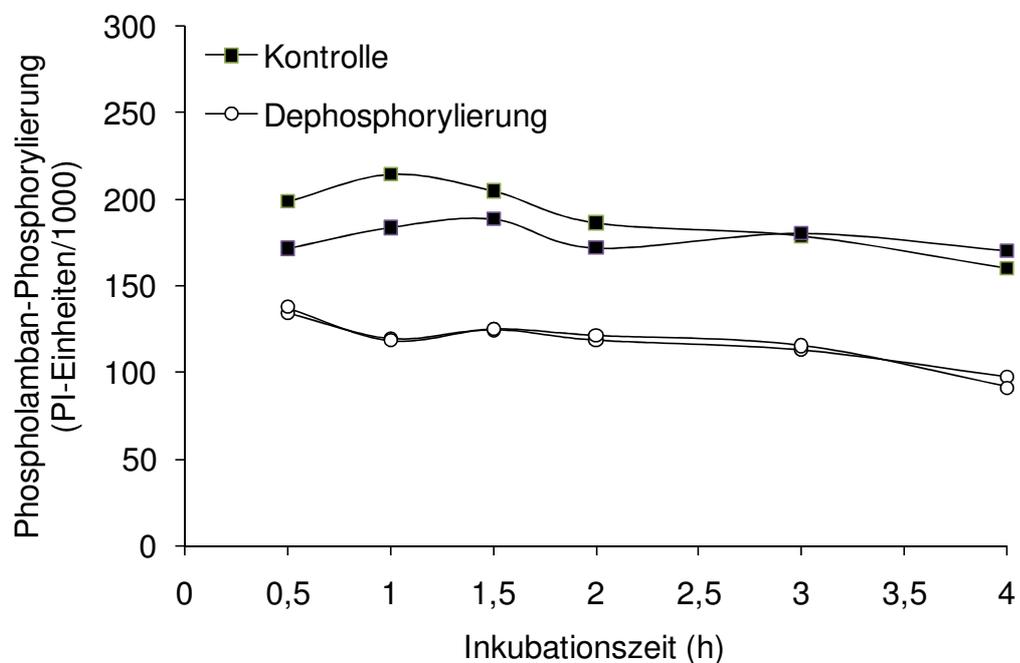


**Abbildung 23: Bestimmung der Phosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-markiertem PLB: Substratabhängigkeit der Dephosphorylierung von [ $^{32}\text{P}$ ]-markiertem PLB durch PP5 unter Kontroll-Bedingung (Ethanol) und nach Stimulierung mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure (2,5  $\mu\text{g}$  PP5, 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure, n = 1).**

Inkubationszeit (h)	0,5		1,0		1,5		2,0		3,0		4,0	
Arachidonsäure ( $\mu\text{M}$ )	200		200		200		200		200		200	
PP5	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+



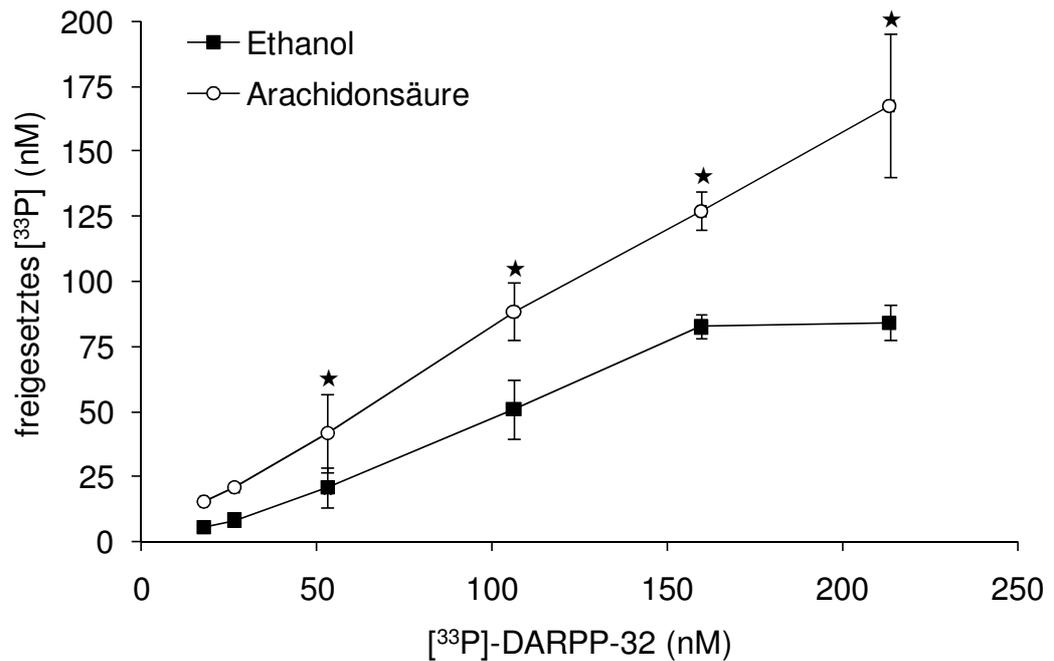
**Abbildung 24: Bestimmung der Phosphorylierung von  $[^{32}\text{P}]$ -markiertem PLB: Beispielaufnahme der Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung von  $[^{32}\text{P}]$ -markiertem PLB durch PP5 (Kontrolle: 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure ohne PP5, Dephosphorylierung: PP5 (2,5  $\mu\text{g}$ ) mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure).**



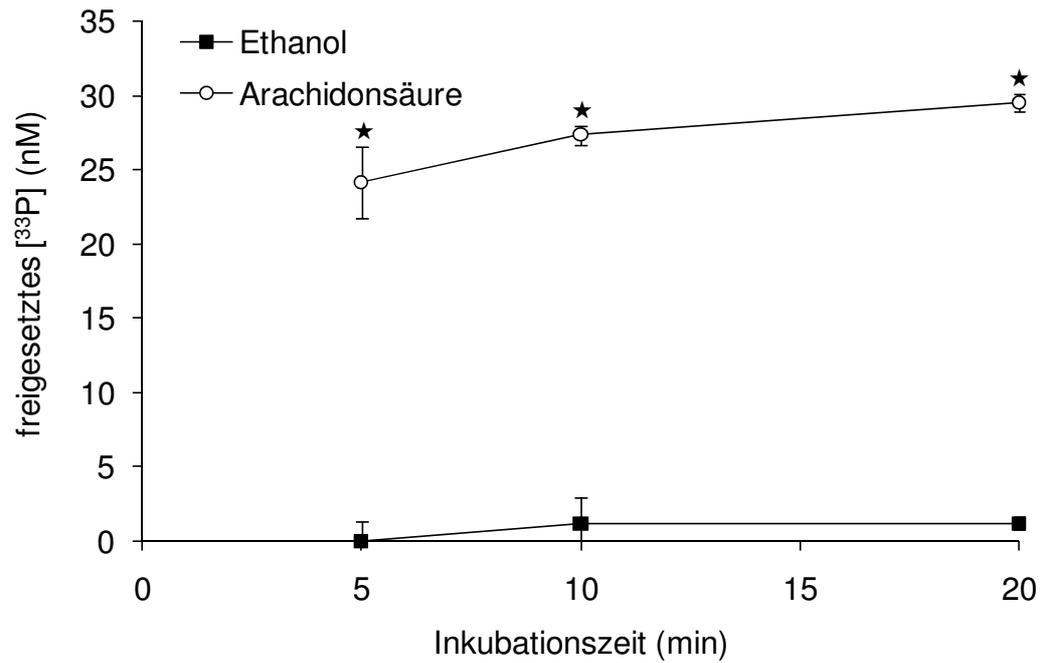
**Abbildung 25: Bestimmung der Phosphorylierung von  $[^{32}\text{P}]$ -markiertem PLB: Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung von  $[^{32}\text{P}]$ -markiertem PLB durch PP5 (Kontrolle: 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure ohne PP5, Dephosphorylierung: PP5 (2,5  $\mu\text{g}$ ) mit 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure, n = 2).**

#### 4.4.1.6. Dephosphorylierung von [<sup>33</sup>P]-DARPP-32

Die Protein-Phosphatase-Aktivität von rekombinanter PP5 gegenüber [<sup>33</sup>P]-markiertem DARPP-32 als Substrat wurde untersucht. Es wurden eine Substratabhängigkeit (Abbildung 26) und eine Zeitabhängigkeit (Abbildung 27) der Dephosphorylierung durchgeführt. Bei beiden Experimenten war die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 gegenüber [<sup>33</sup>P]-markiertem DARPP-32 bei Arachidonsäurestimulierung höher als unter Kontrollbedingungen.



**Abbildung 26: Substratabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 gegenüber [<sup>33</sup>P]-markiertem DARPP-32 unter stimulierten (200  $\mu$ M Arachidonsäure) und unstimulierten Bedingungen (Ethanol,  $\star$   $p < 0,05$  vs. Ethanol,  $n = 3$ ).**



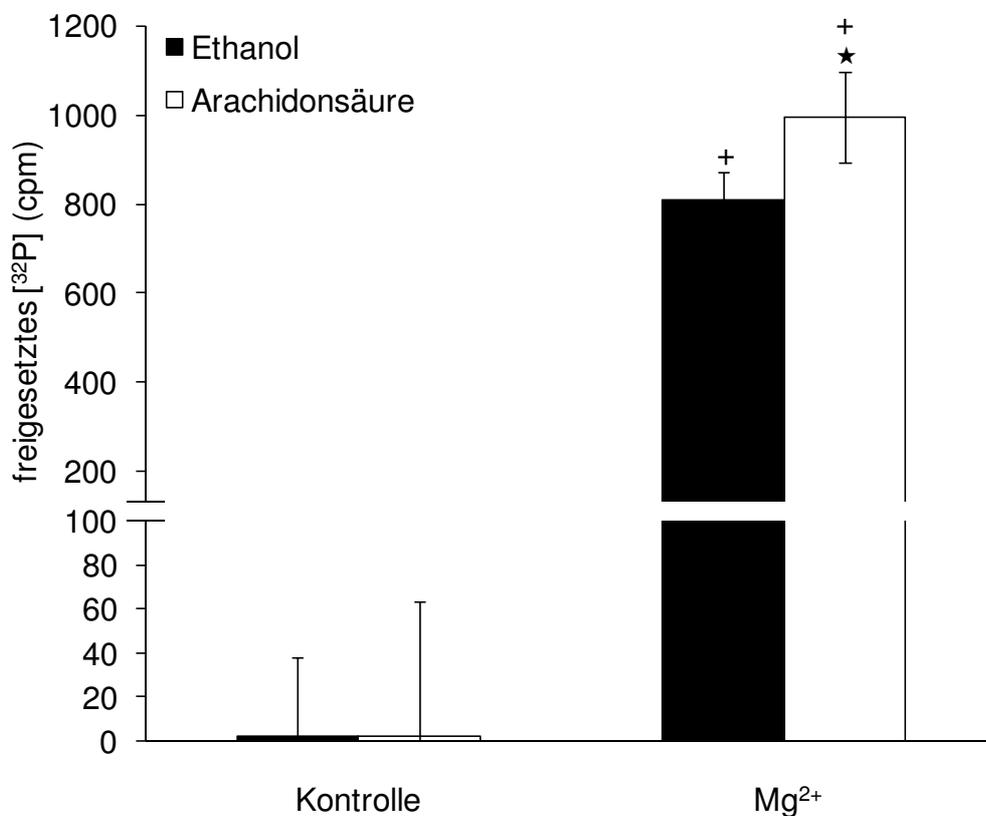
**Abbildung 27: Zeitabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 gegenüber  $[^{33}\text{P}]$ -markiertem DARPP-32 unter stimulierten (200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure) und unstimulierten Bedingungen (Ethanol,  $\star p < 0,05$  vs. Ethanol,  $n = 3$ ).**

#### 4.4.2. PP2C $\beta$

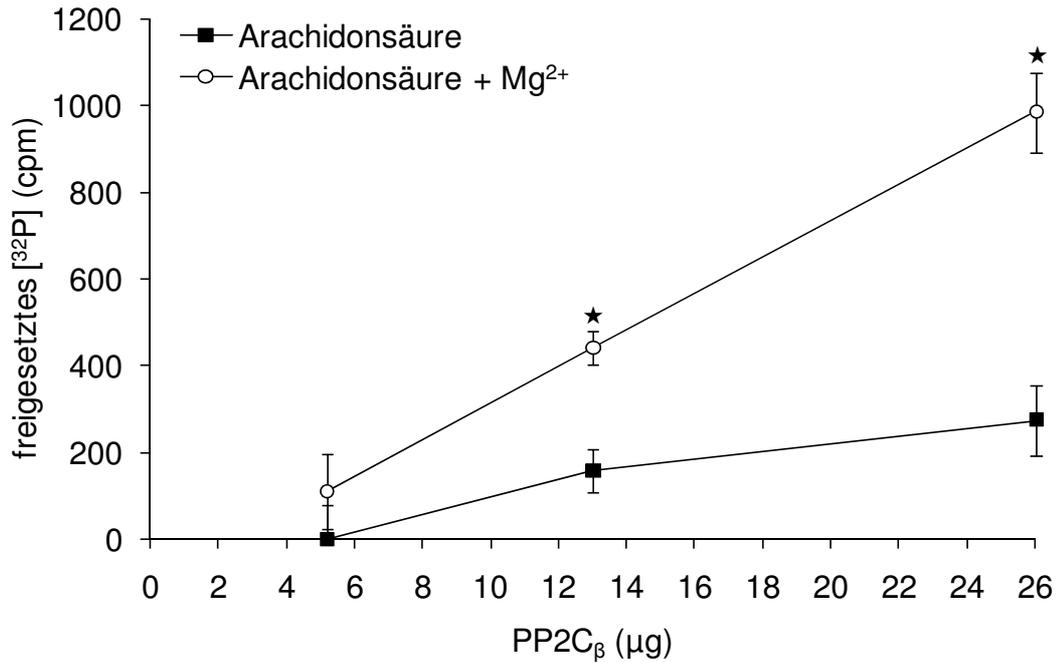
##### 4.4.2.1. Dephosphorylierung von [ $^{32}$ P]-Casein

Die Protein-Phosphatase-Aktivität rekombinanter PP2C $\beta$  wurde mit [ $^{32}$ P]-Casein als Substrat in Abhängigkeit von Mg $^{2+}$  (0,7 mM) und Arachidonsäure (500  $\mu$ M) untersucht. PP2C $\beta$  war ohne Mg $^{2+}$  nicht aktiv. Die Aktivität war mit Magnesiumacetat stark erhöht und konnte durch Arachidonsäure nicht weiter gesteigert werden (Abbildung 28).

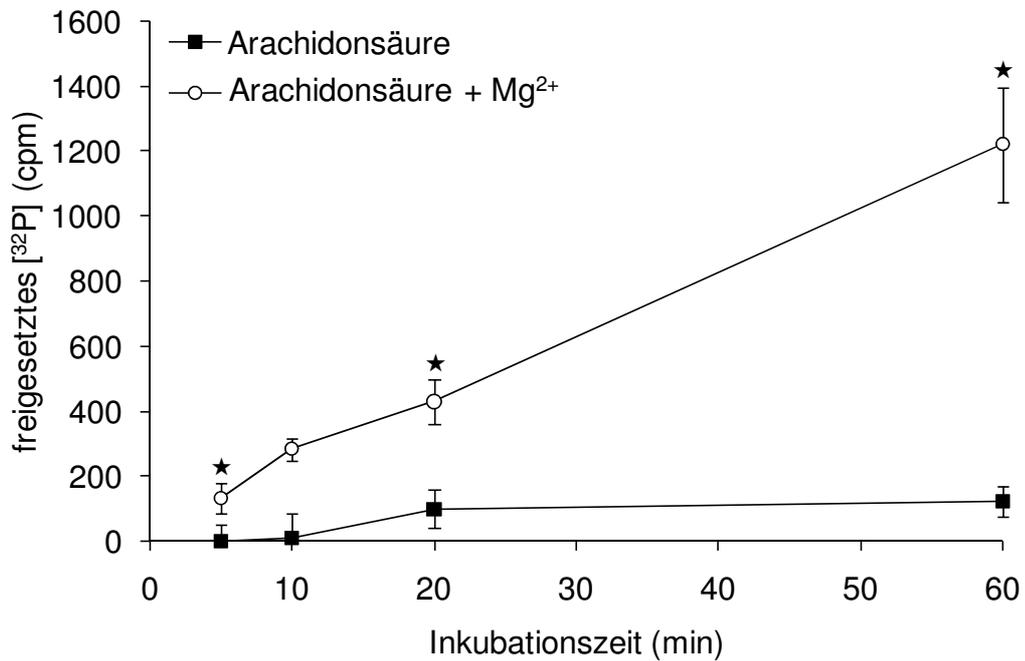
Die Protein-Phosphatase-Aktivität der rekombinanten PP2C $\beta$  wurde in einer Proteinabhängigkeit (5,2 – 26 ng) und einer Zeitabhängigkeit (26 ng PP2C $\beta$ ) untersucht. Bedingungen waren Arachidonsäure ohne Mg $^{2+}$  und Arachidonsäure mit 0,7 mM Mg $^{2+}$  (Abbildung 29 und Abbildung 30). Die unspezifische Aktivität war jeweils geringer als 10 % der eingesetzten Gesamtaktivität.



**Abbildung 28:** Abhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität der rekombinanten PP2C $\beta$  (13 ng) gegenüber [ $^{32}$ P]-Casein von Mg $^{2+}$  und Arachidonsäure ( $\star$   $p < 0,05$  vs. Ethanol, +  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 3$ ).



**Abbildung 29: Proteinabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität der PP2C $\beta$  gegenüber [ $^{32}$ P]-Casein in Gegenwart von 200  $\mu$ M Arachidonsäure allein oder zusammen mit 0,7 mM Mg $^{2+}$  ( $\star$  p < 0,05 vs. Arachidonsäure, n = 3).**



**Abbildung 30: Zeitabhängigkeit der Protein-Phosphatase-Aktivität der PP2C $\beta$  gegenüber [ $^{32}$ P]-Casein in Gegenwart von 200  $\mu$ M Arachidonsäure allein oder zusammen mit 0,7 mM Mg $^{2+}$  ( $\star$  p < 0,05 vs. Arachidonsäure, n = 3).**

#### 4.4.2.2. Dephosphorylierung membrangebundener Phosphopeptide durch PP2C $\beta$ im Vergleich zur PP5

Vergleichend zur Dephosphorylierung membrangebundener Phosphopeptide durch PP5 wurde ein Versuch mit rekombinanter PP2C $\beta$  durchgeführt (Tabelle 2). Potentielle Substrate der PP2C $\beta$  waren folgende Peptide: CICC S687/S1392, IP3R S1588, Kir2.3 S443, PLC- $\gamma$ 1 S1248, Spannungs-abhängiger L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal (Herz)  $\alpha$ 1-Untereinheit (LTCC- $\alpha$ 1, S1487/S1889/1897), CREMt S113, B2AR S261/S262/S345/S346, Kv4.2 $\alpha$  S552, Na-K-H1 $\alpha$  und Na-K-H1 $\alpha$  (Herz) S525/S528/S943, PLB S16, PLM S88, PPP1R9B S94, MBP-C S282/S273/S302, cAMP-spezifische Phosphodiesterase PDE4D3 (PDE4D3, S129), EF-2-Kinase S499, Kir2.1 K<sup>+</sup>-Kanal (Kir2.1, S426), TnI S23/S24, BAD S155, PLC- $\beta$ 3 S1105, CREB S133, Glykogen-bindende Untereinheit der Protein-Phosphatase 1 (Glykogen PP1, S44), NHE3 S540 und PDE3B S10.

**Tabelle 2: Vergleich der Dephosphorylierung der Peptidmembranen mit PP5 (n = 3) und PP2C $\beta$  (n = 1).**

Substrat:	Position auf Membran	PP2C $\beta$ (% Dephosphorylierung)	PP5 (% Dephosphorylierung $\pm$ SEM)
B <sub>2</sub> AR S261P	D1/D6	11	4 $\pm$ 1
B <sub>2</sub> AR S262P	E1/E6	11	2 $\pm$ 2
B <sub>2</sub> AR S345P	F1/F6	26	16 $\pm$ 7
B2AR S346P	G1/G6	30	11 $\pm$ 5
BAD S155P	C1/C6	16	9 $\pm$ 1
CICC S1392P	L1/L6	41	0
CICC S1502P	D4/D9	4	2 $\pm$ 1
CICC S687P	K1/K6	11	4 $\pm$ 3
CREB S133P	A2/7	12	8 $\pm$ 5
CREMt S113P	B2/B7	33	21 $\pm$ 4
EF-2-Kinase S499P	D2/D7	21	16 $\pm$ 9
Glykogen PP1 S44P	F2/F7	11	5 $\pm$ 5
Glykogen PP1 S67P	G2/G7	7	3 $\pm$ 2
hERG S1140P	I2/I7	8	6 $\pm$ 2
hERG S285P	H2/H7	5	4 $\pm$ 1
IP3R S1588P	J2/J7	36	5 $\pm$ 1
IP3R S1755P	K2/K7	4	3 $\pm$ 1
Kir2.1 S426P	L2/L7	17	8 $\pm$ 9
Kir2.3 S443P	M2/M7	34	15 $\pm$ 6
Kir6.2 S372P	N2/N7	5	1 $\pm$ 0,4
Kv4.2 $\alpha$ S552P	B3/B8	26	17 $\pm$ 12
LTCC- $\alpha$ 1 S1487P	C4/C9	34	0

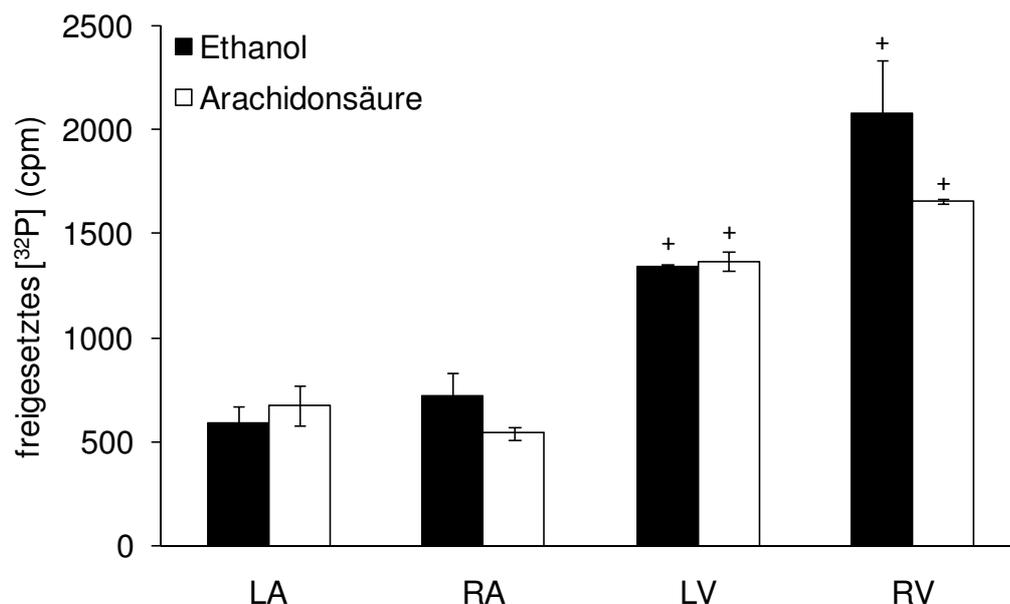
LTCC-a1 S1597P	M1/M6	4	1 ± 1
LTCC-a1 S1889P	F4/F9	14	1 ± 1
LTCC-a1 S1897P	G4/G9	15	2 ± 2
MBC-C S302P	E3/E8	20	6 ± 2
MBP-C S273P	C3/C8	20	4 ± 1
MBP-C S282P	D3/D8	22	13 ± 4
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz) S525P	K4/K9	21	1 ± 1
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz) S528P	L4/L9	25	9 ± 5
Na-K-H1 <sub>α</sub> S943P	F3/F8	11	2 ± 2
NHE3 S540P	G3/G8	11	8 ± 2
NHE3 S593P	H3/H8	4	0
PDE3B S10P	J1/J6	10	24 ± 3
PDE4D3 S129P	I1/I6	22	1 ± 1
PKA-R1I <sub>α</sub> S96P	H1/H6	9	4 ± 0,2
PLB S16P	J3/J8, N5/N10, M5/M10	24	21 ± 3
PLC-β3 S1105P	K3/K8	13	3 ± 1
PLC-γ1 S1248P	L3/L8	34	20 ± 9
PLM S88P	I3/I8	23	6 ± 1
PPP1R9B S94P	M3/M8	22	14 ± 3
RyR2 S2808P	B4/B9	8	7 ± 4
TnI S23P	M4/M9	17	11 ± 2
TnI S24P	N4/N9	13	11 ± 2

#### 4.4.3. Protein-Phosphatase-Aktivität in menschlichen Herzhomogenaten

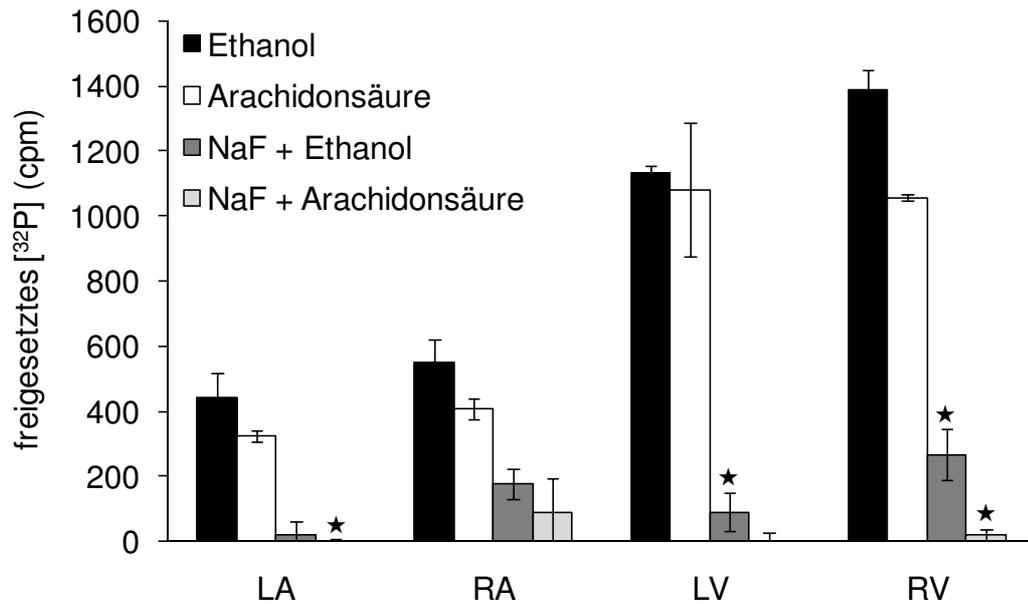
##### 4.4.3.1. Dephosphorylierung von [ $^{32}$ P]-Casein

In linken und rechten Ventrikeln (LV, RV) von explantierten Herzen sowie linken und rechten Vorhöfen (LA, RA) von Bypass-operierten Patienten wurde die Protein-Phosphatase-Aktivität gegenüber [ $^{32}$ P]-Casein in Abhängigkeit von 200  $\mu$ M Arachidonsäure bestimmt (Abbildung 31). Es gab keine Unterschiede in der Protein-Phosphatase-Aktivität zwischen der Kontrollbedingung und einer Stimulierung durch Arachidonsäure. Zudem war die Protein-Phosphatase-Aktivität in den Präparationen der Ventrikel höher als in denen der Vorhöfe.

Zusätzlich wurden Versuche mit 50 mM NaF, ein Hemmstoff von Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen, durchgeführt (Abbildung 32). Die Protein-Phosphatase-Aktivität sank durch NaF nur teilweise auf den Wert der unspezifischen Aktivität, was auf das Vorhandensein von Phosphatasen, die nicht durch NaF gehemmt wurden, schließen ließ. Da im Reaktionsansatz EDTA und EGTA enthalten waren, konnte PP2C als Phosphatase ausgeschlossen werden. Andererseits zeigen die Ergebnisse auch, dass ein Großteil der Phosphatasen in den Präparationen durch NaF gehemmt werden.



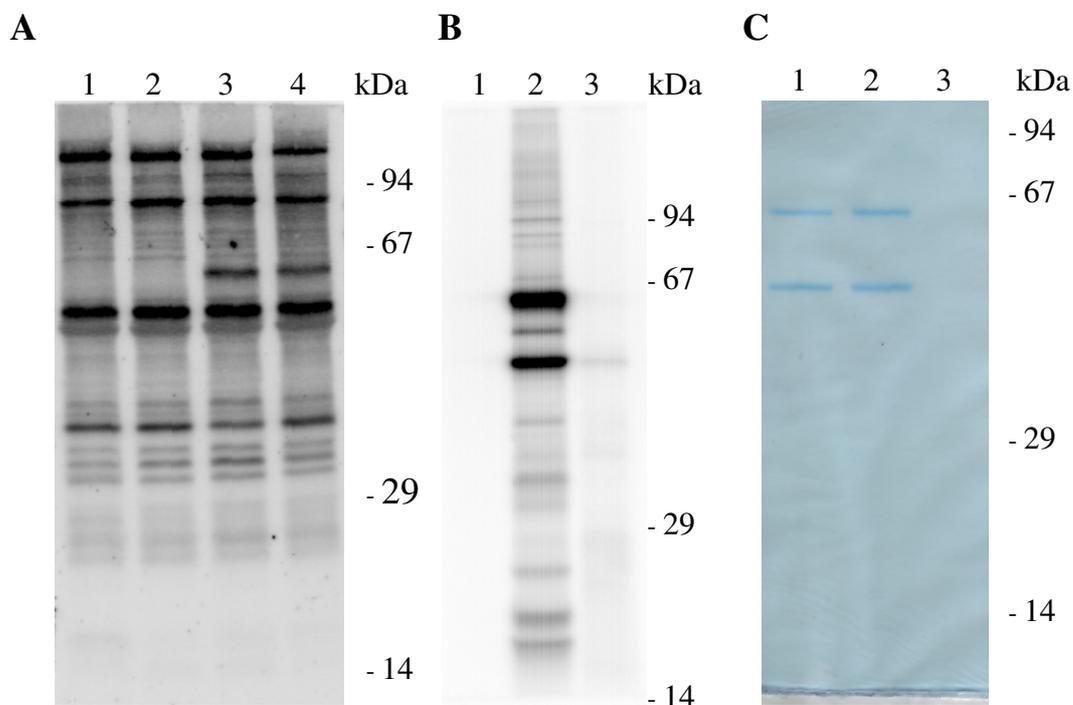
**Abbildung 31: Protein-Phosphatase-Aktivität in menschlichen Herzhomogenaten (LA, RA, LV, RV) gegenüber [ $^{32}$ P]-Casein in Abhängigkeit von 200  $\mu$ M Arachidonsäure (+  $p < 0,05$  vs. Vorhof,  $n = 3$ ).**



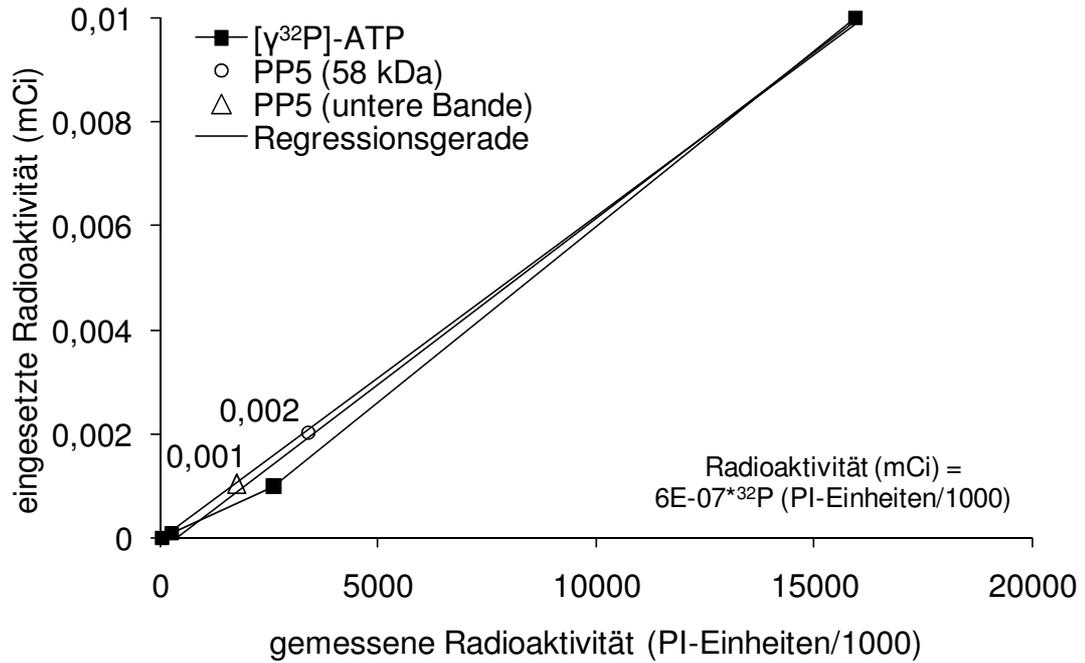
**Abbildung 32: Protein-Phosphatase-Aktivität in menschlichen Herzhomogenaten (LA, RA, LV, RV) gegenüber  $^{32}\text{P}$ -Casein in Abhängigkeit von 50 mM NaF und 200  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure ( $\star p < 0,05$  vs. korrespondierende Bedingung ohne NaF,  $n = 3$ ).**

#### 4.5. Phosphorylierung von PP5 mit PKA

Um mögliche Unterschiede in der Phosphorylierung von Proteinen des Herzens zwischen WT und PP5-K20-Mäusen zu sehen, wurden je zwei Herzproben beider Genotypen homogenisiert (3.4.2), auf ein Gel aufgetragen und transferiert (3.4.4). Der Blot wurde mit PKA und  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  behandelt und mittels Autoradiografie ausgewertet (3.4.10). Da in der Backphosphorylierung mit PKA eine Bande auf Höhe der PP5 phosphoryliert wurde, wurde eine mögliche Phosphorylierung der PP5 mit PKA *in vitro* untersucht. PP5 konnte durch PKA phosphoryliert werden. Es wurden 0,04 % des eingesetzten  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  pro  $\mu\text{g}$  PP5 eingebaut. Aufgrund des geringen Umsatzes ist eine Phosphorylierung der PP5 durch PKA *in vivo* unwahrscheinlich bzw. funktionell unbedeutend. Phosphorylierungen der PP5 sind bisher nicht bekannt. In der Abbildung 34 wurde eine Autoradiografie mit mehreren auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropften Konzentrationen von  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  ausgewertet, eine Regressionsgerade gebildet und damit die Radioaktivität der PP5-Bande und der unteren Bande aus der Abbildung 33 B berechnet.



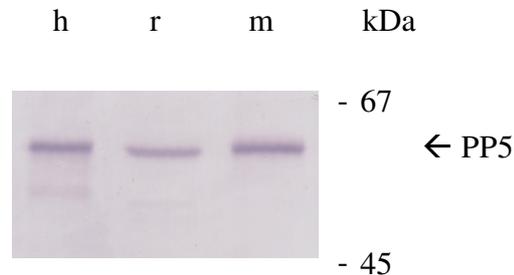
**Abbildung 33: Versuche zur Phosphorylierung von PP5 mit PKA:** A: Autoradiografie einer Backphosphorylierung von Herzproben von WT und PP5-K20 mit PKA (1 und 2: WT, 3 und 4: PP5-K20, kDa: Molekulargewichtsstandard), B: Autoradiografie einer *in vitro* Phosphorylierung rekombinanter PP5 mit PKA (1: PP5 ohne PKA, 2: PP5 mit PKA, 3: PKA ohne PP5, PP5-Bande: 0,002 mCi, eingesetzt: 0,15 mCi  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ), C: Coomassie-Färbung des Gels aus B (1: PP5 ohne PKA, 2: PP5 mit PKA, 3: PKA ohne PP5, kDa: Molekulargewichtsstandard).



**Abbildung 34: Vergleich der eingesetzten Radioaktivität (mCi) von  $[\gamma^{32}P]$ -ATP und der gemessenen Radioaktivität (PhosphorImager-Einheiten). Die ATP-Werte dienen als Eichkurve zur Bestimmung der in PP5 eingebauten Radioaktivität.**

#### 4.6. PP5-Proteinexpression in Herzen verschiedener Spezies

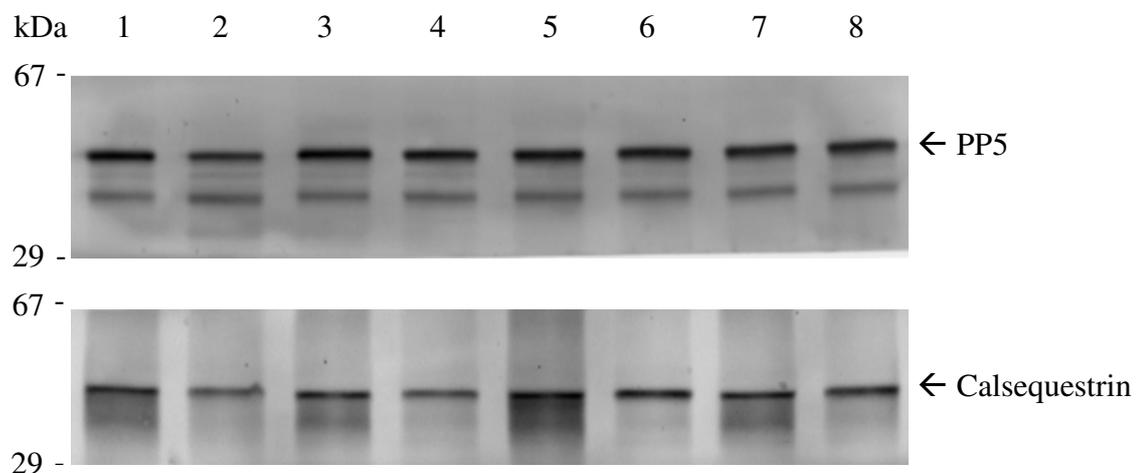
PP5 wurde mittels Westernblot in Homogenaten von Herzen bzw. Herzmuskelzellen verschiedener Spezies nachgewiesen. PP5 kommt in Herzen von Menschen, Ratten und Mäusen vor (Abbildung 35).



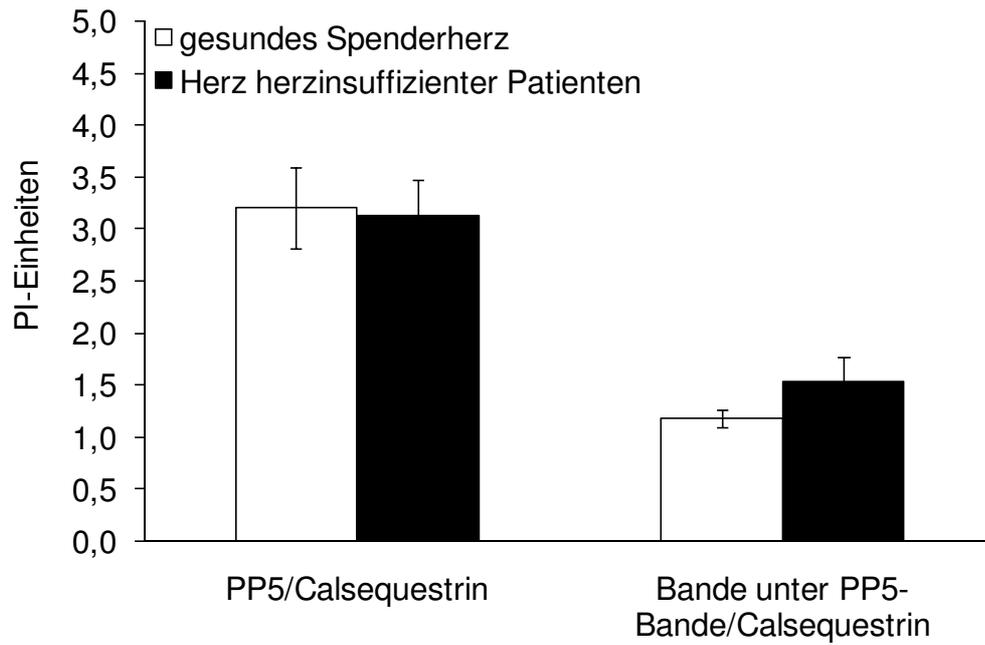
**Abbildung 35: Nachweis der PP5-Proteinexpression im Westernblot in Herzen/Herzmuskelzellen verschiedener Spezies (h: Homogenat des linken Ventrikels eines menschlichen Spenderherzens, r: Homogenat von isolierten Herzmuskelzellen einer adulten Ratte., m: Herzhomogenat einer Wildtyp-Maus, 100µg/Spur, kDa: Molekulargewichts-standard).**

#### 4.7. PP5-Proteinexpression im menschlichen Herzen

Es wurde die PP5-Proteinexpression in Proben des linken Ventrikels von gesunden Spenderherzen, die nicht für Transplantationen geeignet waren, und von Herzen herzinsuffizienter Patienten untersucht. Als Beladungskontrolle in der Gelelektrophorese wurde die Expression von Calsequestrin (CSQ) mittels Westernblot erfasst. Es gab keine Unterschiede in der PP5-Proteinexpression zwischen gesunden und kranken Herzen (Abbildung 37). Außer der PP5-Bande bei 58 kDa war noch eine kleinere Bande im PP5-Westernblot zu sehen (Abbildung 36). Diese Bande könnte, wie schon bei der rekombinanten PP5 gemutmaßt, eine proteolytische Bande der PP5 sein. PP5 war außerdem im rechten und linken Vorhof sowie in der rechten und linken Herzkammer nachweisbar (ohne Abbildung).



**Abbildung 36: PP5- und CSQ-Nachweis in Proben des menschlichen linken Ventrikels (kDa: Molekulargewichtsstandard, 1, 3, 5 und 7: Proben des linken Ventrikels von Spendern, 2, 4, 6, 8: Proben des linken Ventrikels von herzinsuffizienten Patienten).**



**Abbildung 37: Vergleich der PP5-Expression (relativ zu Calsequestrin) und der Expression einer möglichen proteolytischen Bande (relativ zu Calsequestrin) in Proben des menschlichen linken Ventrikels von gesunden Spendern und von herzinsuffizienten Patienten (PI-Einheiten: PhosphorImager-Einheiten, n = 4).**

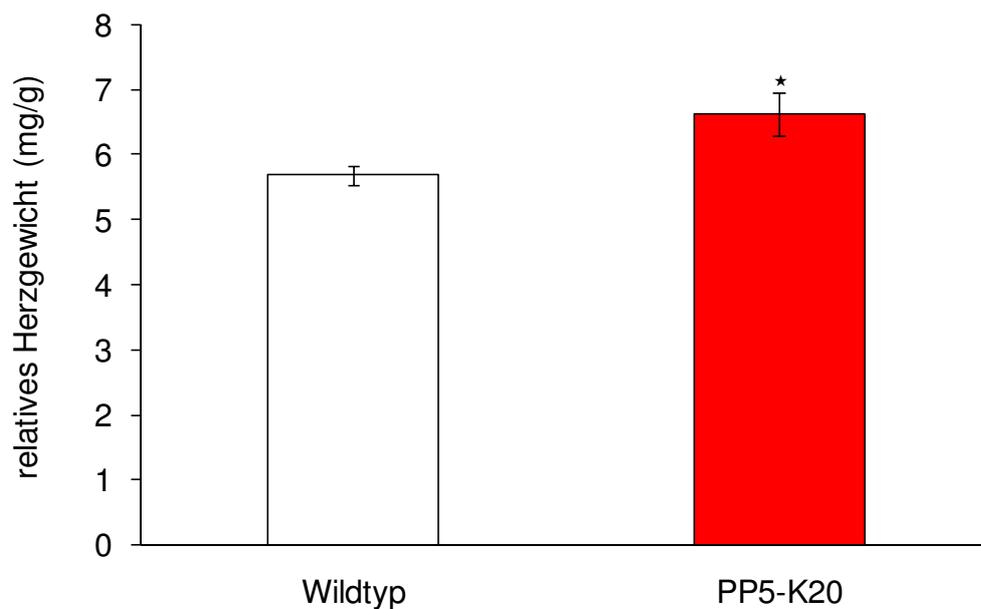
#### 4.8. PP5-transgene Mäuse

Für folgende Versuche dienten Mäuse der Linie PP5-K20. Transgene Tiere zeigten eine Überexpression der PP5 spezifisch im Herz gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die herzspezifische Expression wurde durch den  $\alpha$ -MHC-Promotor kontrolliert (Subramaniam et al., 1991). Transgene Tiere wurden mittels PCR von aus Schwanzspitzen isolierter DNA genotypisiert. Die Überexpression der PP5 wurde außerdem im Westernblot von Herzproben nachgewiesen. Daneben wurde an einer weiteren transgenen Mauslinie mit geringerer Überexpression der PP5 (PP5-K14) die Herzfunktion vergleichend untersucht.

##### 4.8.1. Herzgewicht

Das relative Herzgewicht von Mäusen mit Überexpression der PP5 (PP5-K20) und von Wildtypen wurde erfasst. Das relative Herzgewicht berechnet sich aus dem Quotienten des absoluten Herzgewichts (mg) und des Körpergewichts (g).

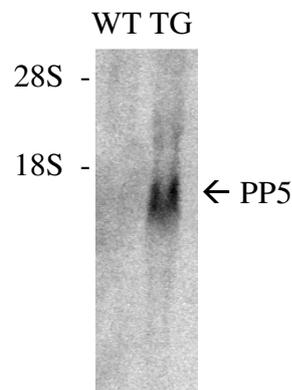
Das relative Herzgewicht von 6 – 8 Monate alten transgenen Tieren ist gegenüber Wildtypen erhöht (Abbildung 38). Dieser Unterschied im relativem Herzgewicht ist bei 4 Monate alten Tieren noch nicht vorhanden (Gergs et al., 2004b).



**Abbildung 38: relatives Herzgewicht (mg/g) von Mäusen der Linie PP5-K20 (★  $p < 0,05$  vs. WT, Alter: 6 - 8 Monate,  $n = 19 - 20$ ).**

#### 4.8.2. PP5-mRNA-Expression in Herzen von Wildtyp- und PP5-transgenen Mäusen

Exemplarisch wurde an einem Wildtyp und einer transgenen Maus (TG) die PP5-Expression im Herzen auf mRNA-Ebene untersucht. Für die Hybridisierung wurde eine für das Transgen spezifische Sonde eingesetzt. Die Expression der Ratten-PP5 war nur in den Herzen transgener Mäuse nachweisbar (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Northernblot zum Nachweis der PP5-mRNA in einer Herzprobe von WT und PP5-K20.**

#### 4.8.3. PP5-Proteinexpression in Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen

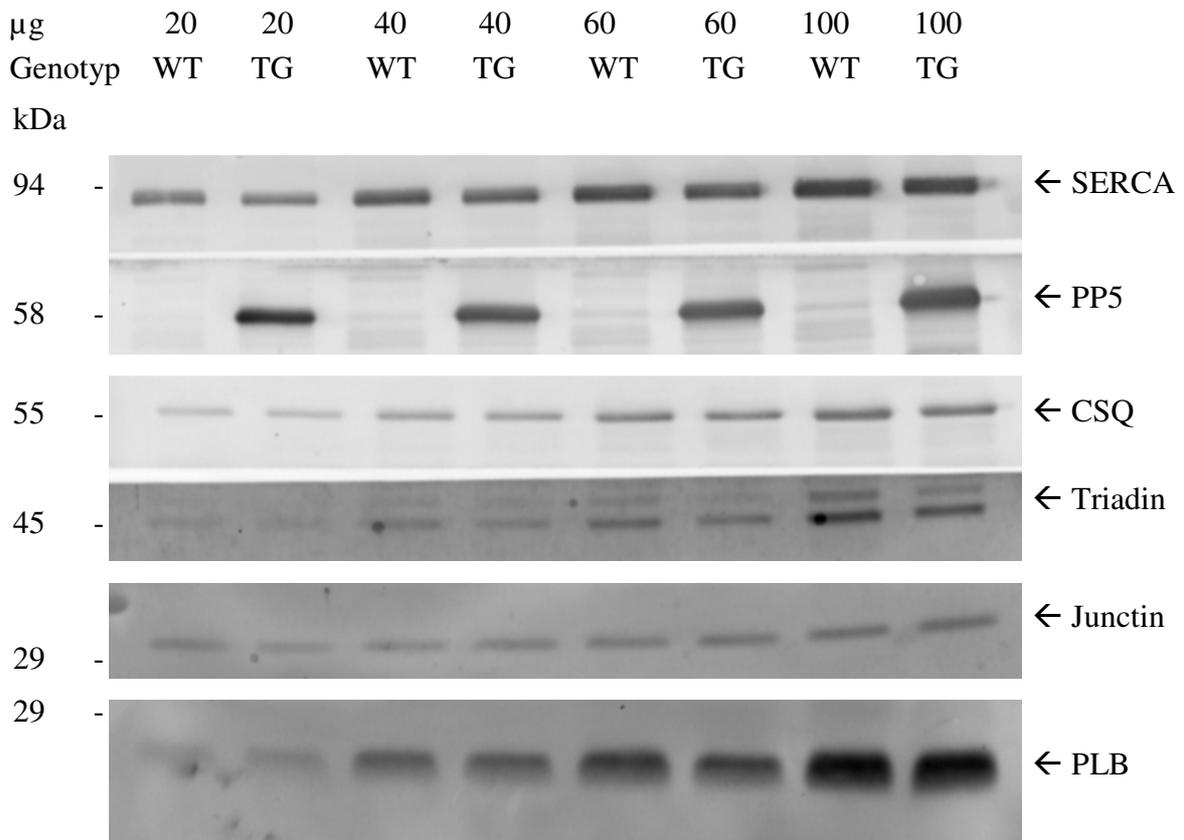
Die PP5-Proteinexpression im Herzen wurde in Membran-Homogenaten und Zytosol-Homogenaten von Wildtyp-Mäusen und PP5-K20-Mäusen untersucht. Bei beiden Genotypen war PP5 in der Membran- und in der Zytosolfraction nachweisbar. Die PP5-Proteinexpression im Herzen war bei PP5-K20-Tieren erhöht.



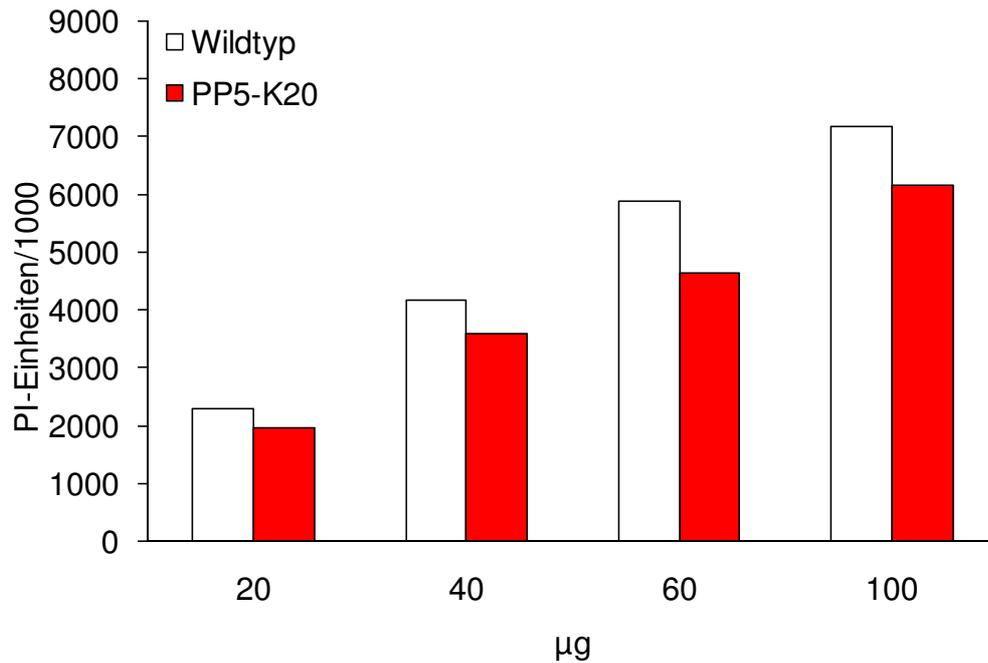
**Abbildung 40: Expression der PP5 in Zytosol und in Membran. Untersucht wurden vergleichend Herzen von WT und PP5-K20 (1: Membran-Herzhomogenat von WT, 2: Membran-Herzhomogenat von PP5-K20, 3: Zytosol-Herzhomogenat von WT, 4: Zytosol-Herzhomogenat von PP5-K20, kDa: Molekulargewichtsstandard, n = 1).**

#### 4.8.4. Expression regulatorischer Proteine in Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen

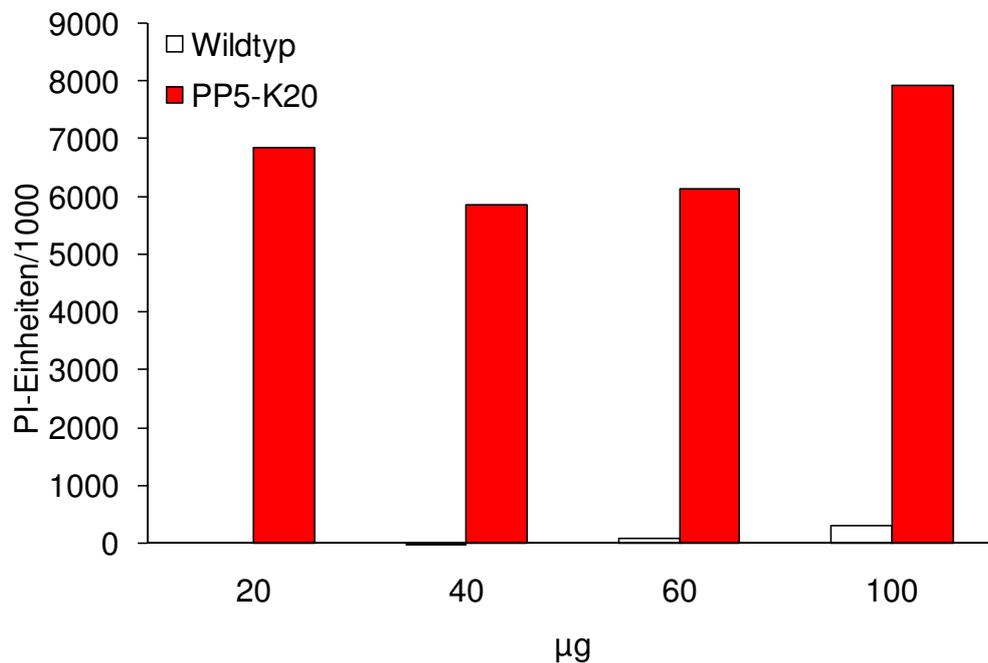
Die Expression wichtiger regulatorischer Proteine des Calciumhaushalts im Herzen, die Einfluss auf die Kontraktivität haben, wurde mittels Westernblot untersucht. Es gab keine Unterschiede in der Expression der Proteine SERCA, CSQ, Triadin, Junctin und PLB im Herzen zwischen Wildtypen (WT) und transgenen Tieren (TG). Die Proteinexpression der PP5 war bei transgenen Tieren erhöht (Abbildung 41 - Abbildung 46).



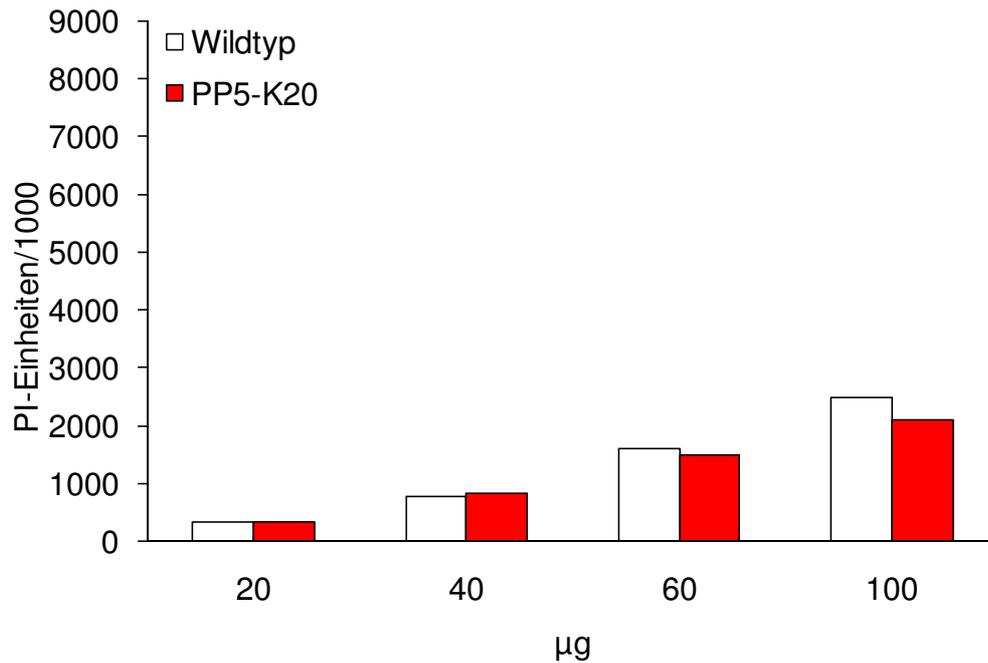
**Abbildung 41: Nachweis der Expression von SERCA, PP5, CSQ, Triadin, Junctin und PLB im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**



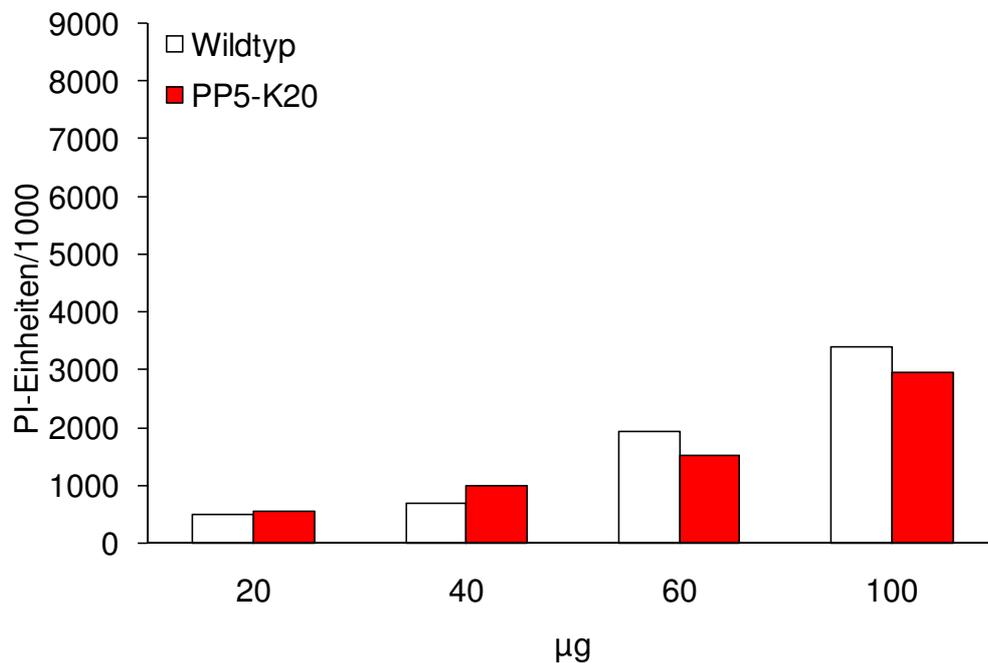
**Abbildung 42: Expression von SERCA im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**



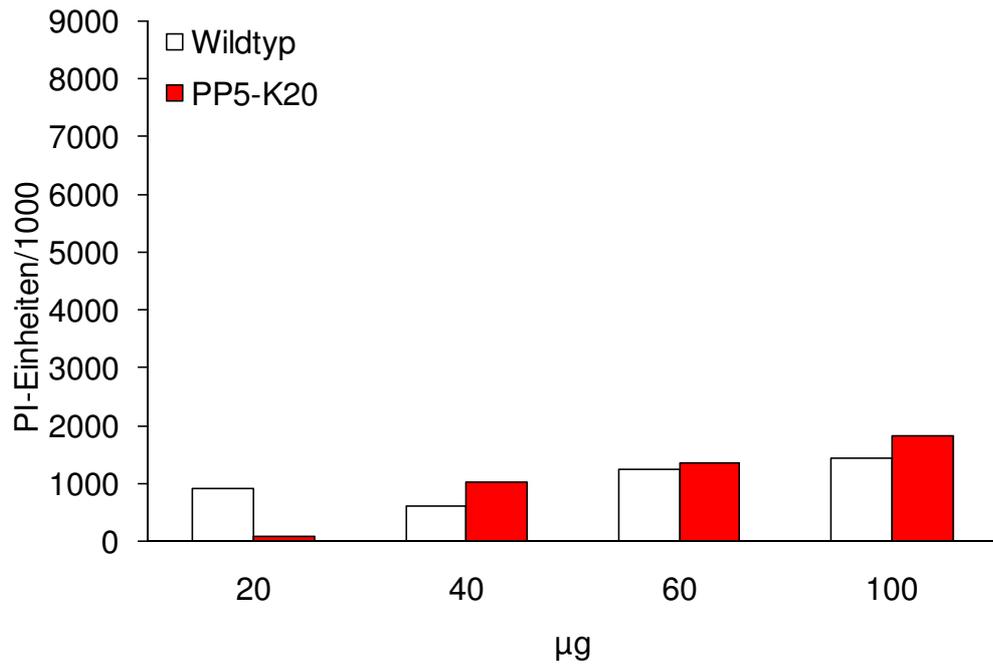
**Abbildung 43: Expression von PP5 im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**



**Abbildung 44: Expression von CSQ im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**



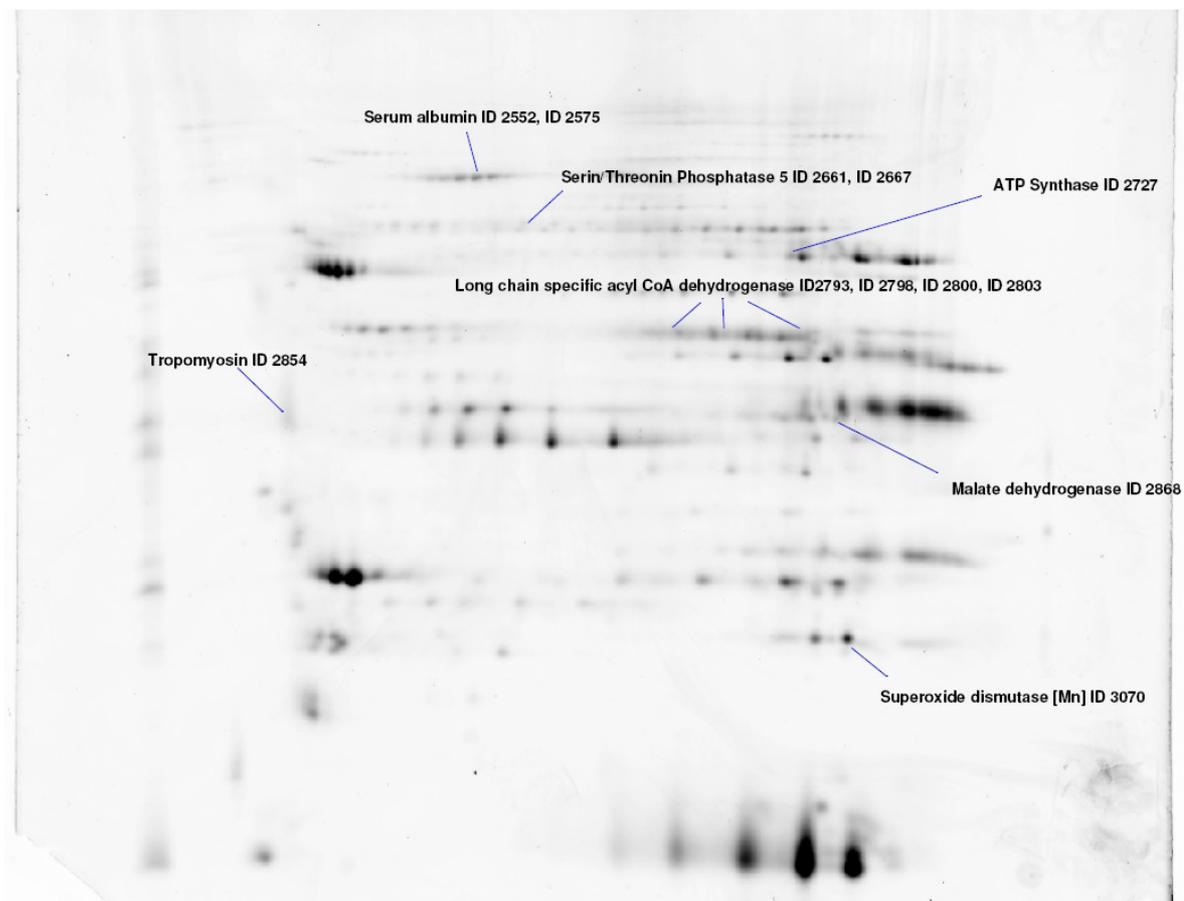
**Abbildung 45: Expression von Triadin im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**



**Abbildung 46: Expression von Junctin im Westernblot von Homogenaten perfundierter Herzen der Linie PP5-K20 im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt ist hier eine Proteinabhängigkeit (20, 40, 60 und 100 µg Protein, n = 1).**

#### 4.8.5. Differentielle Proteinexpression

Mittels 2D-Elektrophorese (DIGE, n = 3) wurden Herzen von Wildtyp und PP5-K20-Tieren hinsichtlich der Proteinexpression untersucht. In den Herzen transgener Tiere war die Expression der Protein-Phosphatase 5 (ID2661 und ID2667), Serum-Albumins (ID2552 und ID2575), der ATP-Synthase (ID2727), der Ethanolamin-Kinase 1 (ID2872), der Malat-DH (ID2868) und des Tropomyosins (ID2854) erhöht. Die unidentifizierten Proteine ID2652, ID2827 und ID3223 zeigten in Herzen von transgenen Tieren eine erhöhte Expression gegenüber Herzen von Wildtypen. Die Expression der Langketten-spezifischen Acyl-CoA-DH (ID2793, ID2798, ID2800 und ID2803), der  $\beta$ -Enolase (ID2754), der  $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins (ID2935), des eukaryotischen Elongationsfaktor 1  $\epsilon$ 1 (ID2781), der Phosphoglycerat-Mutase (ID3013) und der Superoxiddismutase (ID3070) war reduziert. Die Expression der unidentifizierten Proteine ID2503, ID2778, ID2780, ID2787, ID2828, ID2869, ID2928, ID3066 und ID3084 war gegenüber Herzen von Wildtypen reduziert (Abbildung 47 und Tabelle 3).



**Abbildung 47: 2D-Gelelektrophorese einer Herzprobe einer Wildtyp- und einer PP5-K20-Maus. Verändert exprimierte Proteine sind gekennzeichnet.**

**Tabelle 3: Quantifizierung und Identifikation differenziell exprimierter Proteine in Herzen von Wiltp und PP5-K20. Es sind 12 Proteine dargestellt, die mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Bei 12 IDs war eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie nicht erfolgreich (n = 2).**

Protein	Expression	Diagramm	WT 1	WT 2	TG 1	TG 2
ATP-Synthase	erhöht	ID2727 				
Ethanolamin-Kinase 1	erhöht	ID2872 				
Malat-DH	erhöht	ID2868 				
PP5	erhöht	ID2661, [...] 				
PP5	erhöht	ID2667 				
Serum-Albumin	erhöht	ID2552 				
Serum-Albumin	erhöht	ID2575 				
Tropomyosin $\alpha$	erhöht	ID2854, [...] 				
unidentifiziertes Protein ID2652	erhöht	ID2652 				
unidentifiziertes Protein ID2827	erhöht	ID2827 				
unidentifiziertes Protein ID3223	erhöht	ID3223 				
$\beta$ -Enolase	reduziert	ID2754 				
Elektronentransfer Flavoprotein $\alpha$ -Untereinheit	reduziert	ID2935 				
Eukaryotischer Elongationsfaktor 1 $\epsilon$ 1	reduziert	ID2781 				
Langketten-spezifische Acyl-CoA-DH	reduziert	ID2793 				

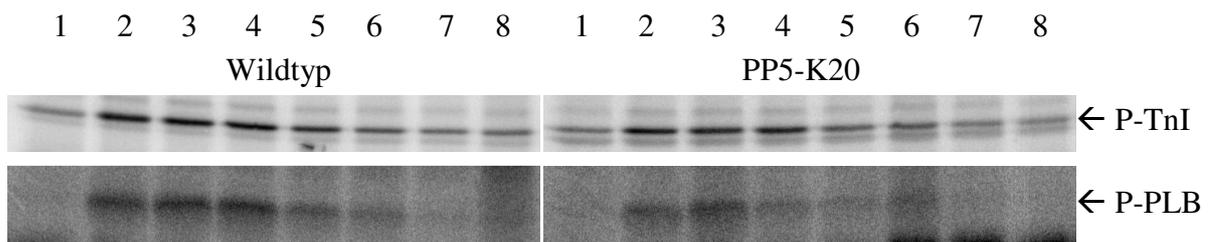
Langketten-spezifische Acyl-CoA-DH	reduziert	ID2798 	
Langketten-spezifische Acyl-CoA-DH	reduziert	ID2800 	
Langketten-spezifische Acyl-CoA-DH	reduziert	ID2803 	
Phosphoglycerat-Mutase	reduziert	ID3013, [...] 	
Superoxid-Dismutase	reduziert	ID3070 	
unidentifiziertes Protein ID 3084	reduziert	ID3084, [...] 	
unidentifiziertes Protein ID2503	reduziert	ID2503 	
unidentifiziertes Protein ID2778	reduziert	ID2778 	
unidentifiziertes Protein ID2780	reduziert	ID2780 	
unidentifiziertes Protein ID2787	reduziert	ID2787 	
unidentifiziertes Protein ID2828	reduziert	ID2828 	
unidentifiziertes Protein ID2869	reduziert	ID2869 	
unidentifiziertes Protein ID2928	reduziert	ID2928, [...] 	
unidentifiziertes Protein ID3066	reduziert	ID3066 	

#### 4.8.6. $\beta$ -adrenerge Stimulierung isolierter Herzmuskelzellen

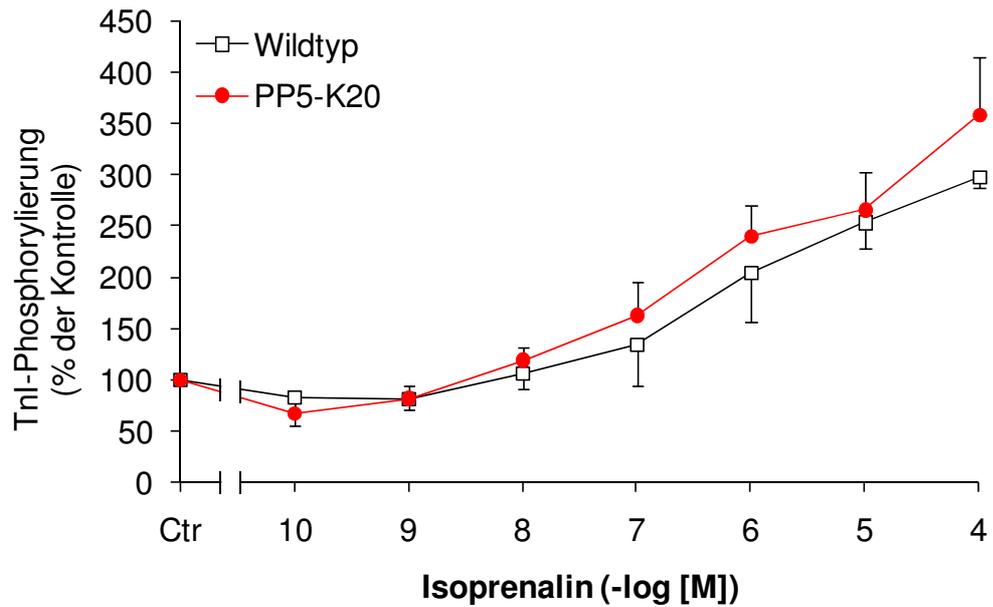
##### 4.8.6.1. $\beta$ -adrenerge Stimulierung [ $^{32}\text{P}$ ]-markierter Herzmuskelzellen

Es wurden Herzmuskelzellen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen isoliert, radioaktiv markiert und mit  $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  M Isoprenalin bzw. Puffer behandelt. Mittels Autoradiografie wurde die Phosphorylierung von Troponin-Inhibitor (TnI) und PLB bestimmt (Abbildung 48).

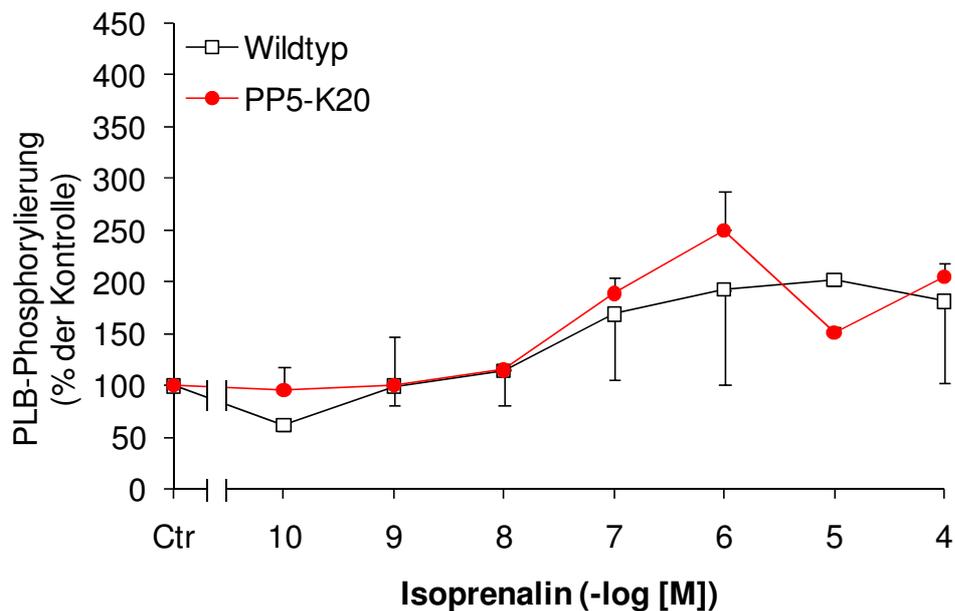
Die Phosphorylierung von TnI und von PLB wurde quantifiziert. Abbildung 49 und Abbildung 50 zeigen die Ergebnisse. Es gab keine Unterschiede in der Phosphorylierung der beiden Proteine zwischen den Genotypen.



**Abbildung 48:** Autoradiografie [ $^{32}\text{P}$ ]-markierter und mit  $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  M Isoprenalin bzw. mit Puffer behandelte Herzmuskelzellen von WT und PP5-K20 (P-TnI: phosphorylierter TnI, P-PLB: phosphoryliertes PLB, 1: Kontrollbedingung, 2:  $10^{-4}$  M Isoprenalin, 3:  $10^{-5}$  M Isoprenalin, 4:  $10^{-6}$  M Isoprenalin, 5:  $10^{-7}$  M Isoprenalin, 6:  $10^{-8}$  M Isoprenalin, 7:  $10^{-9}$  M Isoprenalin, 8:  $10^{-10}$  M Isoprenalin).



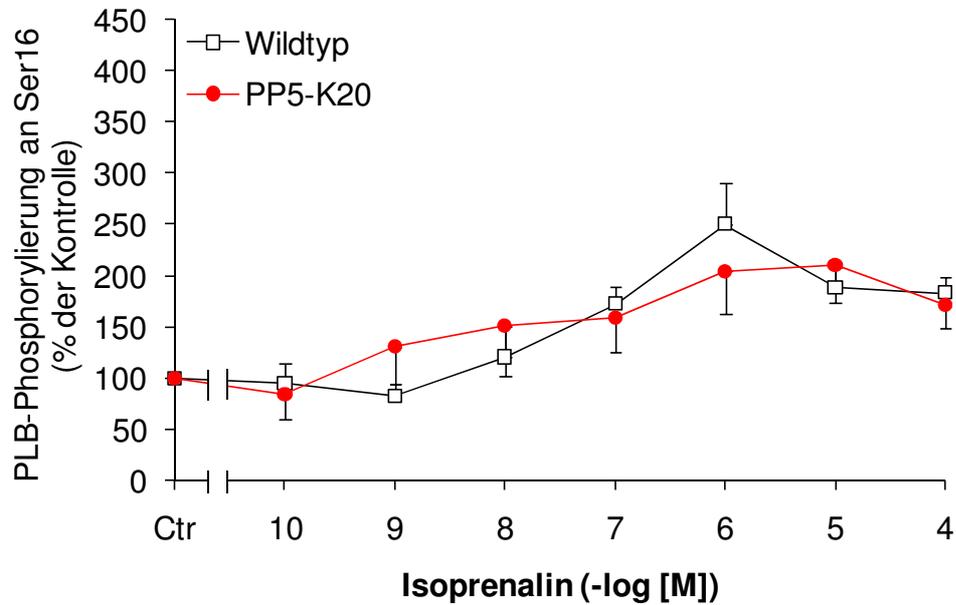
**Abbildung 49:** Phosphorylierung von TnI nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit Isoprenalin ( $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  M) in radioaktiv markierten Herzmuskelzellen von WT und PP5-K20. Ctr: Kontrolle (n = 3).



**Abbildung 50:** Phosphorylierung von PLB nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit Isoprenalin ( $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  M) in radioaktiv markierten Herzmuskelzellen von WT und PP5-K20. Ctr: Kontrolle (n = 3).

#### 4.8.6.2. $\beta$ -adrenerge Stimulierung unmarkierter Zellen

Es wurden Zellen, wie in 3.5.7.2 beschrieben, behandelt. Die Phosphorylierung von PLB an Ser16 wurde mittels Westernblot ermittelt und mit der im Westernblot erfassten CSQ-Expression abgeglichen. Es gab keine Unterschiede in der Phosphorylierung von PLB an Ser16 bei Wildtyp-Zellen und Zellen von transgenen Tieren.



**Abbildung 51: Phosphorylierung von PLB an Ser16 nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit Isoprenalin ( $10^{-10}$  bis  $10^{-4} M$ ) in Herzmuskelzellen von WT und PP5-K20 (n = 3).**

#### 4.8.7. Kontraktilität der Herzen von Wildtyp- und PP5-transgenen Mäusen – Vergleich von zwei transgenen Tierlinien

Mit dem Modell des „isoliert-perfundierten Arbeit-leistenden Herzens“ wurden Parameter der Herzfunktion unter Basalbedingungen und nach Stimulierung durch  $10^{-6}$  M Isoprenalin im Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und PP5-transgenen Mäusen untersucht.

Untersuchte Tierlinien waren PP5-K20 und PP5-K14, wobei die Linie PP5-K20 eine stärkere Überexpression des Transgens als die Linie PP5-K14 zeigte (4fache vs. 3fache Überexpression, Gergs et al., 2004b). Im Vergleich der Linien PP5-K20 und PP5-K14 zeigte sich eine Abhängigkeit der Herzfunktion vom Überexpressionsniveau der PP5 im Herz.

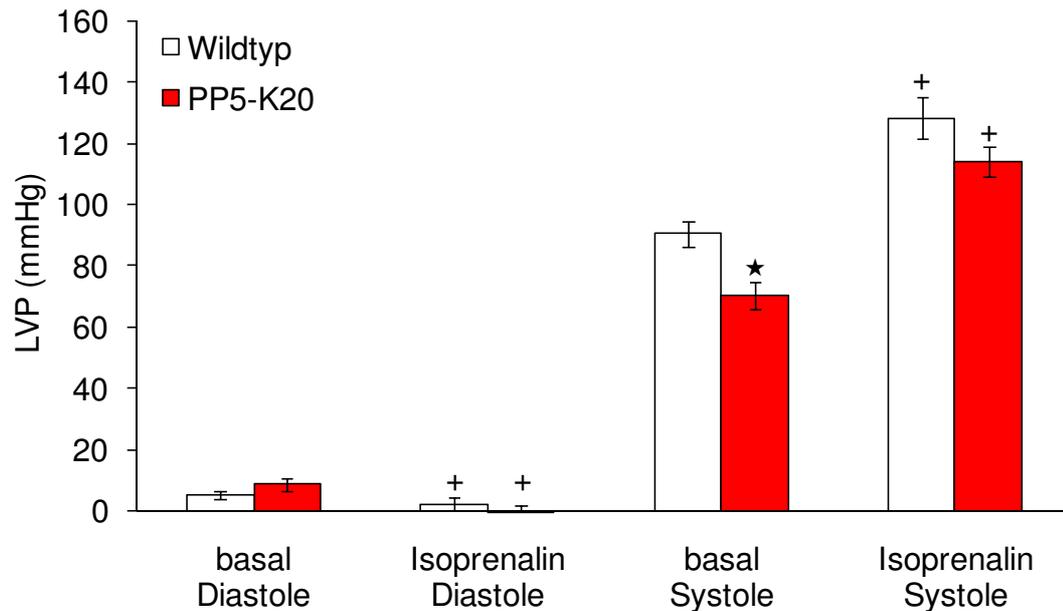
Zur Veranschaulichung sind alle Parameter, bei denen es Unterschiede zwischen den Genotypen der Linie PP5-K20 gab, in Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt. Unter Basalbedingungen zeigten Herzen transgener Tiere einen niedrigeren links-ventrikulären systolischen Druck (LVSP). In der Linie PP5-K14 gab es dagegen keine Unterschiede im LVSP. Durch Isoprenalin sank bei beiden untersuchten Genotypen der Linie PP5-K20 der links-ventrikuläre diastolische Druck (LVDP), der LVSP stieg an.

Die Relaxationszeit (Tf10-90) war in den Herzen transgener Tiere der Linie PP5-K20 sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Isoprenalin-Stimulierung gegenüber Wildtypen verlängert. Bei beiden Genotypen kam es zu einer Verkürzung der Relaxationszeit nach Isoprenalin-Stimulierung. Dagegen gab es in der Linie PP5-K14 keine Unterschiede in der Relaxationszeit zwischen den Genotypen unter Basalbedingungen und nach Isoprenalin-Stimulierung. Bei beiden Genotypen der Linie PP5-K14 kam es zu einer Verkürzung der Relaxationszeit nach Isoprenalin-Stimulierung.

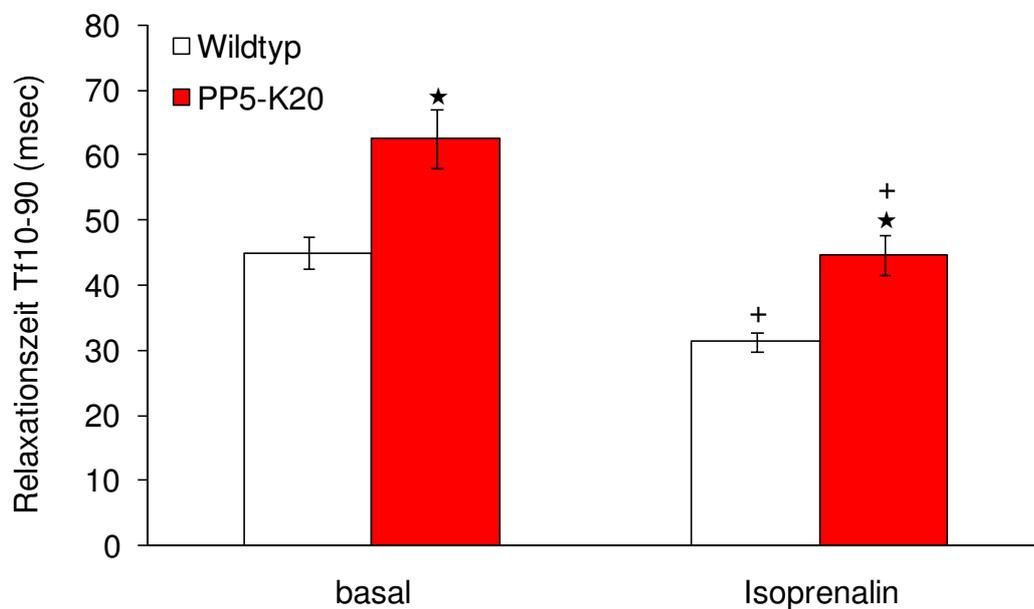
Die Herzfrequenz stieg bei beiden Genotypen der Linien PP5-K20 und PP5-K14 durch Isoprenalin an. Unter Basalbedingungen und nach Isoprenalin-Stimulierung war die Herzfrequenz bei transgenen Tieren der Linie PP5-K20 niedriger als bei Wildtypen. Dagegen gab es keine Unterschiede zwischen den Genotypen der Linie PP5-K14.

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dP/dt) und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt) des linksventrikulären Drucks waren unter Basalbedingungen und nach Stimulierung mit Isoprenalin bei transgenen Tieren der Linie PP5-K20 niedriger als bei Wildtypen. Bei transgenen Tieren der Linie PP5-K14 war unter Basalbedingungen die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit niedriger als bei Wildtypen. Die Absolutwerte der 1. Ableitung stiegen sowohl bei Wildtypen als auch bei transgenen Tieren der Linien PP5-K20 und PP5-K14 durch Isoprenalin-Stimulierung an.

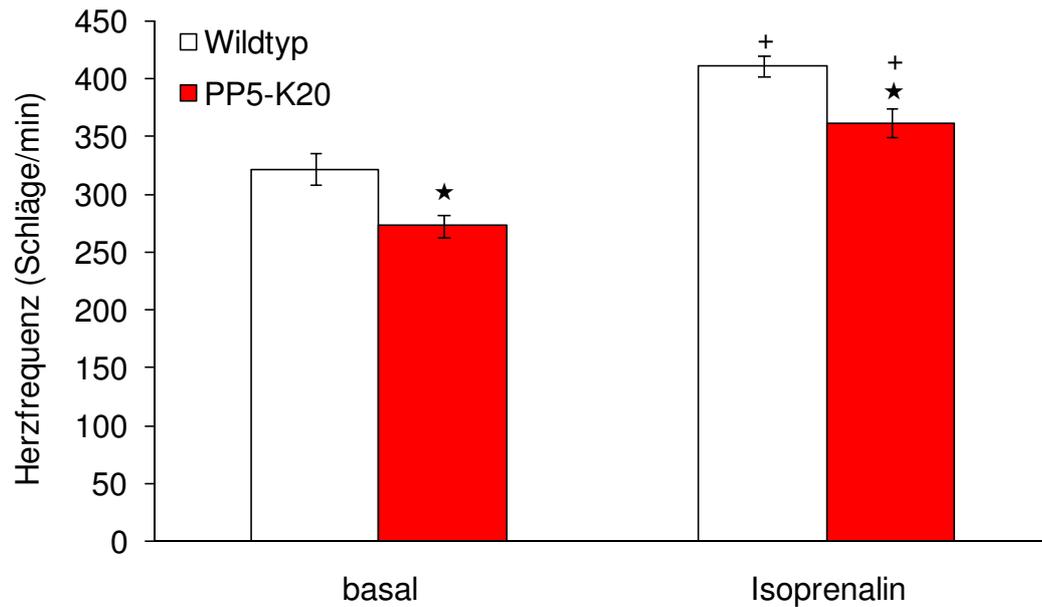
Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin gab es keine signifikanten Unterschiede in den erfassten Parametern der Herzfunktion zwischen Wildtypen und transgenen Mäusen der Linie PP5-K14.



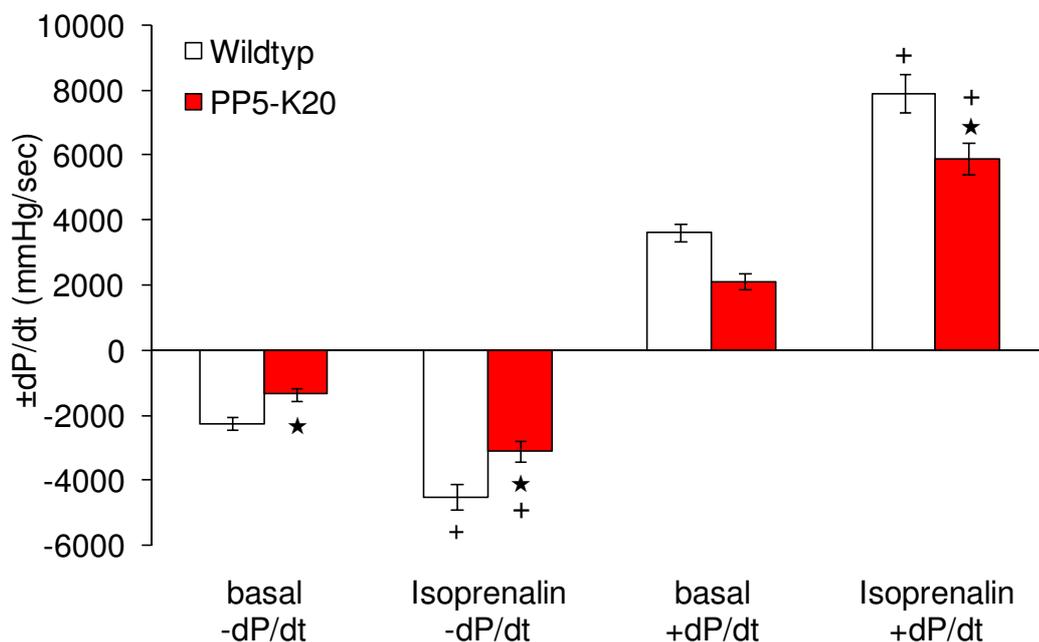
**Abbildung 52: Vergleich von linksventrikulärem diastolischem Druck (LVDP) und linksventrikulärem systolischem Druck (LVSP) zwischen Wildtyp und transgenen Tieren der Linie PP5-K20 unter Basalbedingungen und nach Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin (LVP: linksventrikulärer Druck, ★ p < 0,05 vs. Wildtyp, + p < 0,05 vs. basal, n = 8 - 10).**



**Abbildung 53: Vergleich der Relaxationszeit Tf10-90 (Zeit von 10 % zu 90 % Relaxation) zwischen Wildtyp und transgenen Tieren der Linie PP5-K20 unter Basalbedingungen und nach Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin (★ p < 0,05 vs. Wildtyp, + p < 0,05 vs. basal, n = 8 - 10).**



**Abbildung 54:** Vergleich der Herzfrequenz zwischen Wildtyp und transgenen Tieren der Linie PP5-K20 unter Basalbedingungen und nach Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin ( $\star$   $p < 0,05$  vs. Wildtyp,  $^+$   $p < 0,05$  vs. basal,  $n = 8 - 10$ ).



**Abbildung 55:** Vergleich von Maximum und Minimum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks ( $-dP/dt$  und  $+dP/dt$ ) zwischen Wildtyp und transgenen Tieren der Linie PP5-K20 unter Basalbedingungen und nach Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin ( $\star$   $p < 0,05$  vs. Wildtyp,  $^+$   $p < 0,05$  vs. basal,  $n = 8 - 10$ ).

#### 4.8.7.1. PP5-K20: Basalbedingungen

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Kontraktilitätsdaten unter Basalbedingungen. In die Berechnung wurden sowohl Herzen, die später mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin als auch unter Kontrollbedingungen perfundiert wurden, einbezogen. Der LVDP transgener Mäuse war gegenüber denen von Wildtyp-Mäusen erhöht, der LVSP war dagegen kleiner als bei Wildtyp-Mäusen. Bei transgenen Mäusen waren die Relaxationszeiten gegenüber Wildtyp-Mäusen verlängert. Der diastolische Vorhofdruck war bei transgenen Tieren erhöht und die Herzfrequenz geringer als bei Wildtyp-Mäusen. Die absoluten Werte von  $-dP/dt$  und  $+dP/dt$  waren bei transgenen Tieren niedriger als bei Wildtypen.

**Tabelle 4: Übersicht der Kontraktilitätsdaten von Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Tieren im Modell des isolierten perfundierten Herzens unter Basalbedingungen (\*  $p < 0,05$  vs. WT).**

	<b>Wildtyp</b> (n = 19 - 20)	<b>PP5-K20</b> (n = 18 - 19)
Parameter:	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM
linker Ventrikel:		
LVDP (mmHg):	6 $\pm$ 0,9	10 $\pm$ 1,7*
LVSP (mmHg):	86 $\pm$ 2,6	71 $\pm$ 3,0*
Relaxationszeit linker Ventrikel:		
Tf10-90 (msec):	46 $\pm$ 2,2	60 $\pm$ 3,3*
Tf20-90 (msec):	40 $\pm$ 1,9	52 $\pm$ 2,9*
Tf50-90 (msec):	26 $\pm$ 1,1	33 $\pm$ 1,9*
linker Vorhof:		
diastolischer Druck (mmHg):	15 $\pm$ 1,0	20 $\pm$ 2,2*
systolischer Druck (mmHg):	29 $\pm$ 3,0	38 $\pm$ 3,9
Frequenz (Schläge/Minute):	330 $\pm$ 15,0	286 $\pm$ 7,6*
1. Ableitung des LVP:		
$-dP/dt$ (mmHg/sec):	-2134 $\pm$ 134,7	-1448 $\pm$ 143,5*
$+dP/dt$ (mmHg/sec):	3453 $\pm$ 188,3	2210 $\pm$ 222,5*

#### 4.8.7.2. PP5-K20: $\beta$ -adrenerge Stimulierung

Tabelle 5 fasst die Kontraktilitätsdaten von Wildtyp- und PP5-K20-Herzen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit Isoprenalin zusammen. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung zeigten Herzen transgener Mäuse gegenüber denen von Wildtyp-Mäusen verlängerte Relaxationszeiten, eine niedrigere Herzfrequenz und niedrigere absolute Werte von  $-dP/dt$  und  $+dP/dt$ .

**Tabelle 5: Vergleich der Kontraktilitätsdaten von Herzen von Wildtyp- und PP5-K20-Mäusen im Modell des isolierten perfundierten Herzens nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin (\*  $p < 0,05$  vs. WT).**

	<b>Wildtyp (n = 10)</b>	<b>PP5-K20 (n = 8)</b>
Parameter:	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM
linker Ventrikel:		
LVDP (mmHg):	2 $\pm$ 2,1	0 $\pm$ 2,4
LVSP (mmHg):	128 $\pm$ 6,7	114 $\pm$ 5,0
Relaxationszeit linker Ventrikel:		
Tf10-90 (msec):	31 $\pm$ 1,5	45 $\pm$ 3,0*
Tf20-90 (msec):	28 $\pm$ 1,3	39 $\pm$ 2,5*
Tf50-90 (msec):	18 $\pm$ 0,9	25 $\pm$ 1,7*
linker Vorhof:		
diastolischer Druck (mmHg):	13 $\pm$ 1,1	15 $\pm$ 2,1
systolischer Druck (mmHg):	24 $\pm$ 2,0	34 $\pm$ 6,6
Frequenz (Schläge/Minute):	411 $\pm$ 9,0	362 $\pm$ 12,1*
1. Ableitung des LVP:		
$-dP/dt$ (mmHg/sec):	-4511 $\pm$ 385,3	-3102 $\pm$ 333,5*
$+dP/dt$ (mmHg/sec):	7909 $\pm$ 591,4	5898 $\pm$ 489,3*

#### 4.8.7.3. PP5-K20: Vergleich zwischen Basalbedingungen und $\beta$ -adrenerger Stimulierung

Tabelle 6 zeigt einen Vergleich der basalen Kontraktilitätsdaten und denen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung von Wildtyp- und TG-Herzen. Bei beiden Genotypen stieg nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung der LVSP, der LVDP sank. Die Relaxationszeiten verkürzten sich bei beiden Genotypen. Die Herzfrequenz und die absoluten Werte von  $-dP/dt$  und  $+dP/dt$  erhöhten sich bei beiden Genotypen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulierung.

**Tabelle 6: Vergleich der im Modell des isolierten perfundierten Herzens erfassten Herzfunktionen von Wildtypen und PP5-K20-Tieren zwischen Basalbedingungen und  $\beta$ -adrenerger Stimulierung durch  $10^{-6}$  M Isoprenalin (\*  $p < 0,05$  vs. WT, +  $p < 0,05$  vs. basal).**

Bedingung:	Wildtyp (n = 10)		PP5-K20 (n = 8)	
	basal	$10^{-6}$ M Isoprenalin	basal	$10^{-6}$ M Isoprenalin
Parameter:	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM
linker Ventrikel:				
LVDP (mmHg):	$5 \pm 1,3$	$2 \pm 2,1^+$	$9 \pm 2,3$	$0 \pm 2,4^+$
LVSP (mmHg):	$90 \pm 4,0$	$128 \pm 6,7^+$	$70 \pm 4,4^*$	$114 \pm 5,0^+$
Relaxationszeit linker Ventrikel:				
Tf10-90 (msec):	$45 \pm 2,4$	$31 \pm 1,5^+$	$63 \pm 4,6^*$	$45 \pm 3,0^{**}$
Tf20-90 (msec):	$39 \pm 2,0$	$28 \pm 1,3^+$	$54 \pm 4,0^*$	$39 \pm 2,5^{**}$
Tf50-90 (msec):	$25 \pm 1,2$	$18 \pm 0,9^+$	$34 \pm 2,4^*$	$25 \pm 1,7^{**}$
linker Vorhof:				
diastolischer Druck (mmHg):	$14 \pm 1,7$	$13 \pm 1,1$	$19 \pm 2,9$	$15 \pm 2,1^+$
systolischer Druck (mmHg):	$26 \pm 3,6$	$24 \pm 2,0$	$38 \pm 5,9$	$34 \pm 6,6$
Frequenz (Schläge/Minute):	$322 \pm 13,5$	$411 \pm 9,0^+$	$273 \pm 9,3^*$	$362 \pm 12,1^{**}$
1. Ableitung des LVP:				
$-dP/dt$ (mmHg/sec):	$-2249 \pm 175,0$	$-4511 \pm 385,3^+$	$-1360 \pm 186,0^*$	$-3102 \pm 333,5^{**}$
$+dP/dt$ (mmHg/sec):	$3624 \pm 271,6$	$7909 \pm 591,4^+$	$2119 \pm 260,5^*$	$5898 \pm 489,3^{**}$

#### 4.8.7.4. Phosphorylierung von PLB

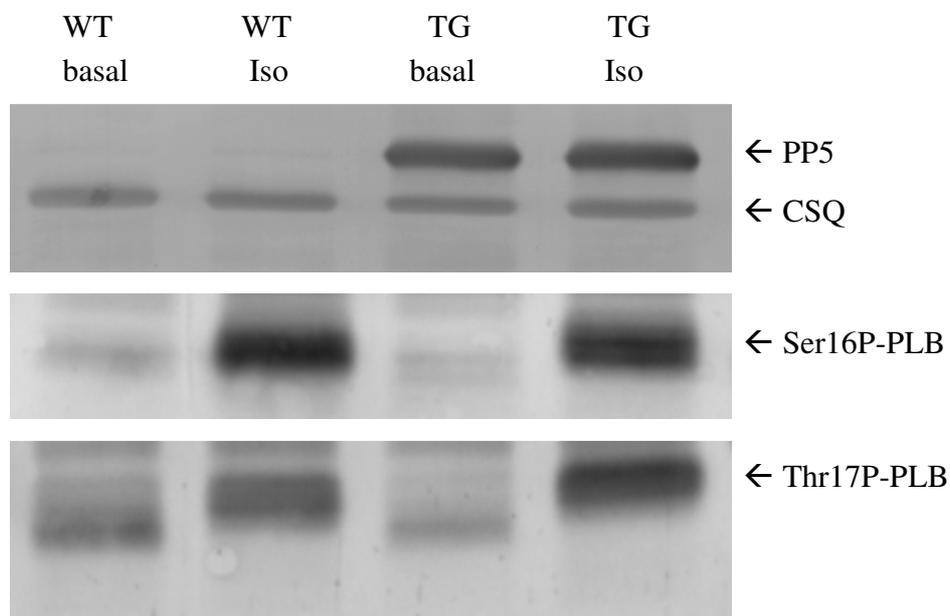
In den Herzen der Linie PP5-K20 aus der Versuchsserie aus 4.8.7 wurde die Phosphorylierung von PLB an Ser16 und Thr17 mittels Westernblot, wie in 3.4.6 beschrieben, bestimmt (Abbildung 56). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung der Gele wurde CSQ im Westernblot parallel bestimmt und die Phosphorylierung von PLB an Ser16 bzw. Thr17 durch die Proteinexpression von CSQ geteilt.

Die Phosphorylierung von PLB an Ser16 war unter Kontrollbedingungen, aber nicht nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung in Herzen von PP5-K20-Tieren geringer als in denen von Wildtypen. Durch  $\beta$ -adrenerge Stimulierung stieg bei beiden Genotypen die Phosphorylierung von Ser16 auf den gleichen Wert an (Abbildung 57).

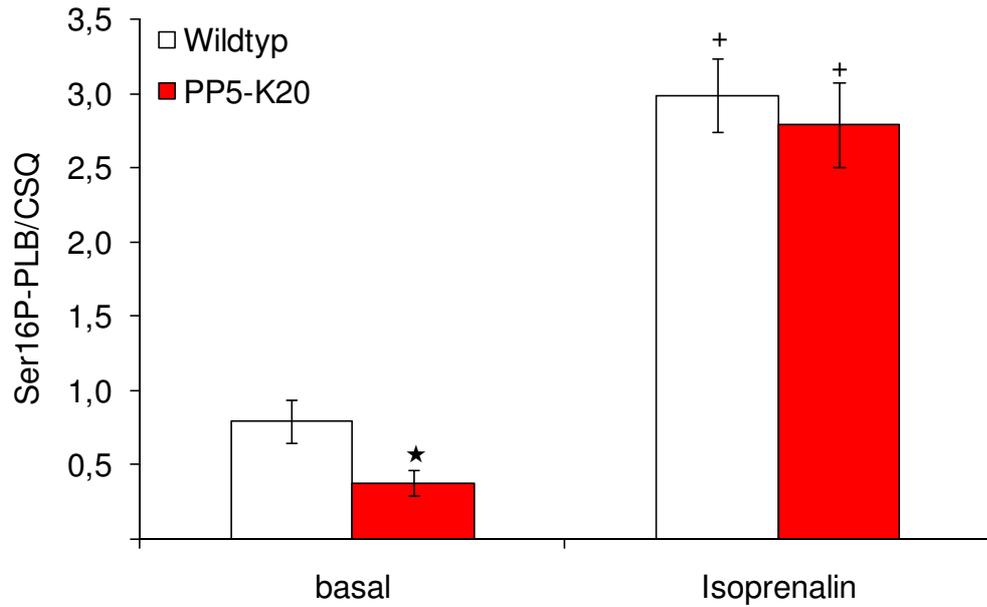
Sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung gab es keine Unterschiede in der Phosphorylierung von PLB an Thr17 zwischen den Genotypen. Bei beiden Genotypen nahm auch hier die Phosphorylierung an Thr17 durch Isoprenalin zu (Abbildung 58).

Weiterhin wurden die Relaxationszeiten (Tf10-90) mit der Phosphorylierung von PLB an Ser16 bzw. Thr17 korreliert (Abbildung 59 und Abbildung 60).

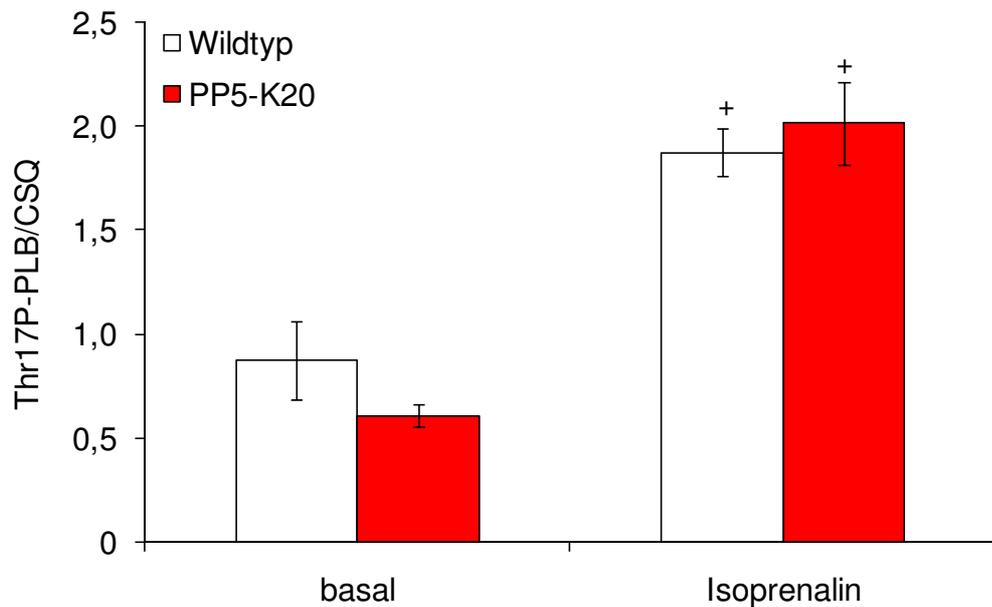
Die Korrelation der Phosphorylierung von PLB an Ser16 und Thr17 mit der Relaxationszeit ist bei den Herzen transgener Tiere nach rechts verschoben.



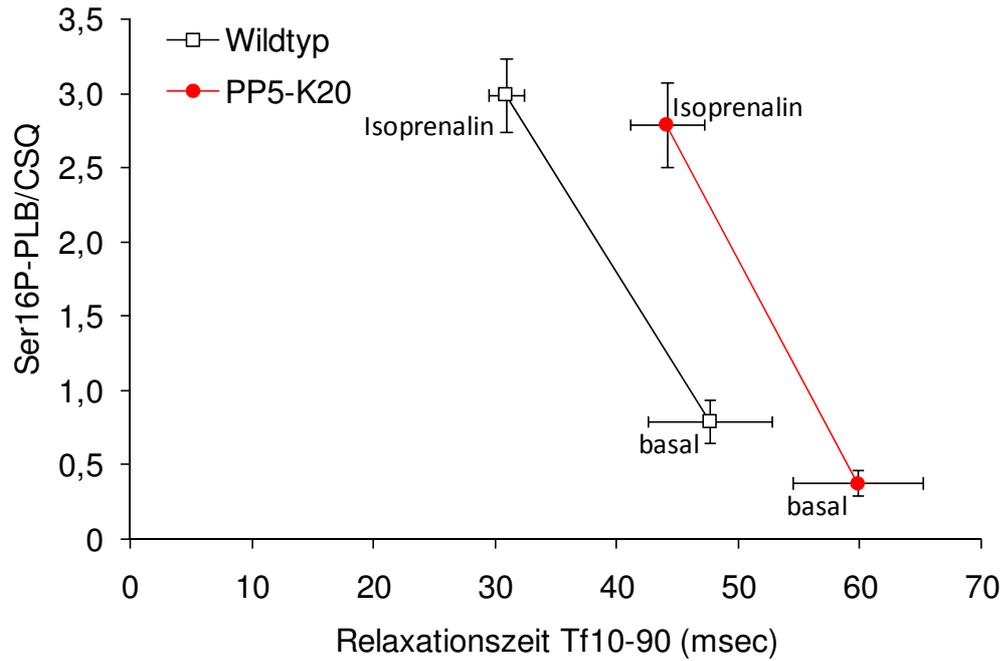
**Abbildung 56:** Beispielblot zum Nachweis von PP5, Calsequestrin (CSQ), Ser16-phosphoryliertem und Thr17-phosphoryliertem Phospholamban (PLB) an unter Basalbedingungen bzw. nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin in perfundierten Herzen. (WT: Herz einer Wildtyp-Maus, TG: Herz einer PP5-K20-Maus, Ko: Kontrollbedingung, Iso:  $\beta$ -adrenerge Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin).



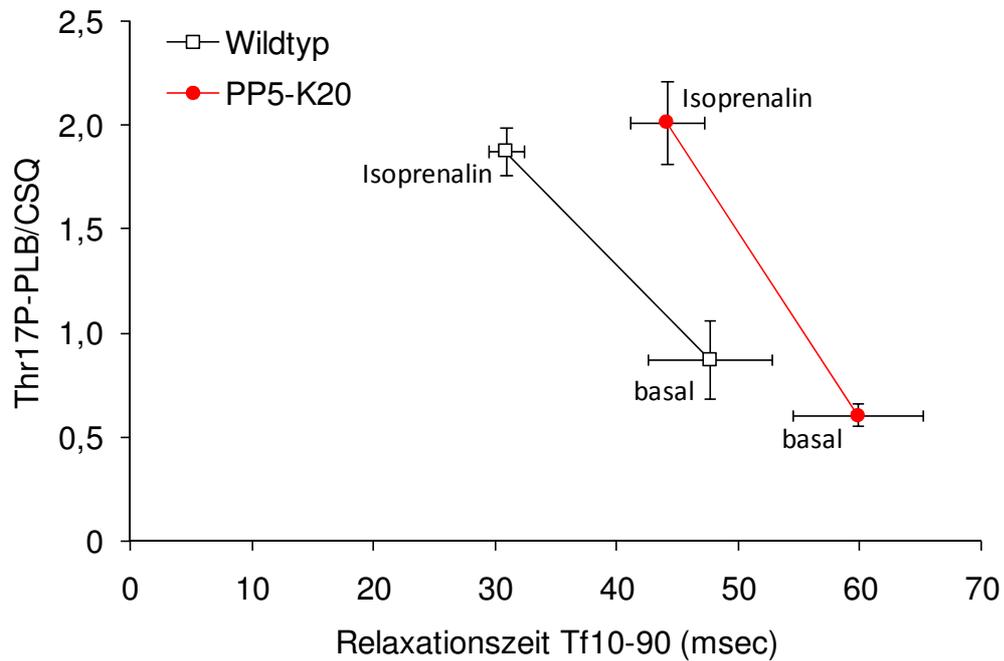
**Abbildung 57: Phosphorylierung von PLB an Ser16 relativ zur CSQ-Expression in Herzen von WT und PP5-K20 (★  $p < 0,05$  vs. WT, +  $p < 0,05$  vs. basal,  $n = 8$ ).**



**Abbildung 58: Phosphorylierung von PLB an Thr17 relativ zur CSQ-Expression in Herzen von WT und PP5-K20 (★  $p < 0,05$  vs. WT, +  $p < 0,05$  vs. basal,  $n = 8$ ).**



**Abbildung 59: Korrelation der Phosphorylierung von PLB an Ser16 und der Relaxationszeit Tf10-90 unter Basalbedingungen bzw. nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin im Vergleich zwischen Herzen von WT und PP5-K20 (n = 7 - 9).**



**Abbildung 60: Korrelation der Phosphorylierung von PLB an Thr17 und der Relaxationszeit Tf10-90 unter Basalbedingungen bzw. nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin im Vergleich zwischen Herzen von WT und PP5-K20 (n = 7 - 9).**

#### 4.8.7.5. PP5-K14: Basalbedingungen

Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Kontraktilitätsdaten unter Basalbedingungen. Es gab keine Unterschiede im LVDP, LVSP, in den Relaxationszeiten, in den Drücken des linken Vorhofs und in der Herzfrequenz zwischen Herzen von Wildtyp- und PP5-K14-Tieren. Das Maximum der 1. Ableitung des LVP war in Herzen von PP5-K14-Mäusen niedriger als in Herzen von Wildtypen.

**Tabelle 7: Übersicht der Kontraktilitätsdaten von Herzen von Wildtyp- und PP5-K14-Mäusen im Modell des isolierten perfundierten Herzens unter Basalbedingungen (\* p < 0,05 vs. WT).**

<b>Genotyp:</b>	<b>Wildtyp (n = 10)</b>	<b>PP5-K14 (n = 9)</b>
Parameter:	Mittelwert ± SEM	Mittelwert ± SEM
linker Ventrikel:		
LVDP (mmHg):	11 ± 2,6	19 ± 4,0
LVSP (mmHg):	83 ± 5,6	67 ± 6,5
Relaxationszeit linker Ventrikel:		
Tf10-90 (msec):	50 ± 3,3	51 ± 3,8
Tf20-90 (msec):	43 ± 2,8	44 ± 3,3
Tf50-90 (msec):	28 ± 1,7	28 ± 2,1
linkes Atrium:		
diastolischer Druck (mmHg):	21 ± 3,3	31 ± 3,0
systolischer Druck (mmHg):	37 ± 5,6	51 ± 6,3
Frequenz (Schläge/Minute):	304 ± 15,5	317 ± 16,0
1. Ableitung des LVP:		
-dP/dt (mmHg/sec):	-1696 ± 258,5	-1107 ± 221,9
+dP/dt (mmHg/sec):	3000 ± 432,9	1701 ± 421,2*

#### 4.8.7.6. PP5-K14: $\beta$ -adrenerge Stimulierung

Tabelle 8 veranschaulicht die Kontraktilitätsdaten der perfundierten Herzen von Wildtyp- und PP5-K14-Mäusen nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin. Es gab keine Unterschiede in den erfassten Parametern der Herzfunktion zwischen Wildtypen und PP5-K14-Mäusen.

**Tabelle 8: Vergleich der Kontraktilitätsdaten von Herzen von Wildtyp- und PP5-K14-Mäusen im Modell des isolierten perfundierten Herzens nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin (\*  $p < 0,05$  vs. WT).**

<b>Genotyp:</b>	<b>Wildtyp (n = 10)</b>	<b>PP5-K14 (n = 8 - 9)</b>
Parameter:	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM
linker Ventrikel:		
LVDP (mmHg):	4 $\pm$ 2,9	8 $\pm$ 5,1
LVSP (mmHg):	122 $\pm$ 9,3	120 $\pm$ 13,9
Relaxationszeit linker Ventrikel:		
Tf10-90 (msec):	40 $\pm$ 1,5	40 $\pm$ 1,6
Tf20-90 (msec):	35 $\pm$ 1,5	35 $\pm$ 1,6
Tf50-90 (msec):	23 $\pm$ 1,5	23 $\pm$ 1,2
linker Vorhof:		
diastolischer Druck (mmHg):	18 $\pm$ 2,5	27 $\pm$ 3,2
systolischer Druck (mmHg):	39 $\pm$ 7,6	45 $\pm$ 6,3
Frequenz (Schläge/Minute):	370 $\pm$ 13,0	358 $\pm$ 18,1
1. Ableitung des LVP:		
-dP/dt (mmHg/sec):	-3364 $\pm$ 423,5	-3013 $\pm$ 524,2
+dP/dt (mmHg/sec):	6269 $\pm$ 830,8	5281 $\pm$ 1061,5

#### 4.8.7.7. PP5-K14: Vergleich zwischen Basalbedingungen und $\beta$ -adrenerger Stimulierung

Tabelle 9 zeigt einen Vergleich der Werte zwischen Basalbedingungen und  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin von Herzen von Wildtypen und PP5-K14-Tieren. Bei beiden Genotypen sank bei Isoprenalingabe der LVDP und der LVSP stieg an, die Relaxationszeiten verkürzten sich, die Herzfrequenz nahm zu und die absoluten Werte von  $-dP/dt$  und  $+dP/dt$  nahmen zu.

**Tabelle 9: Vergleich der im Modell des isolierten perfundierten Herzens erfassten Herzfunktionen von Wildtypen und PP5-K14-Tieren zwischen Basalbedingungen und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung mit  $10^{-6}$  M Isoprenalin (\*  $p < 0,05$  vs. WT, +  $p < 0,05$  vs. basal).**

Bedingung:	Wildtyp (n = 10)		PP5-K14 (n = 8 - 9)	
	basal	$10^{-6}$ M Isoprenalin	basal	$10^{-6}$ M Isoprenalin
Parameter:	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM	Mittelwert $\pm$ SEM
linker Ventrikel:				
LVDP (mmHg):	11 $\pm$ 2,6	4 $\pm$ 2,9 <sup>+</sup>	19 $\pm$ 4,0	8 $\pm$ 5,1 <sup>+</sup>
LVSP (mmHg):	83 $\pm$ 5,6	122 $\pm$ 9,3 <sup>+</sup>	67 $\pm$ 6,5	120 $\pm$ 13,9 <sup>+</sup>
Relaxationszeit linker Ventrikel:				
Tf10-90 (msec):	50 $\pm$ 3,3	40 $\pm$ 1,5 <sup>+</sup>	51 $\pm$ 3,8	40 $\pm$ 1,6 <sup>+</sup>
Tf20-90 (msec):	43 $\pm$ 2,8	35 $\pm$ 1,5 <sup>+</sup>	44 $\pm$ 3,3	35 $\pm$ 1,6 <sup>+</sup>
Tf50-90 (msec):	28 $\pm$ 1,7	23 $\pm$ 1,5 <sup>+</sup>	28 $\pm$ 2,1	23 $\pm$ 1,2 <sup>+</sup>
linker Vorhof:				
diastolischer Druck (mmHg):	21 $\pm$ 3,3	18 $\pm$ 2,5 <sup>+</sup>	31 $\pm$ 3,0	27 $\pm$ 3,2 <sup>+</sup>
systolischer Druck (mmHg):	37 $\pm$ 5,6	39 $\pm$ 7,6	51 $\pm$ 6,3	45 $\pm$ 6,3
Frequenz (Schläge/Minute):	304 $\pm$ 15,5	370 $\pm$ 13,0 <sup>+</sup>	317 $\pm$ 16,0	358 $\pm$ 18,1 <sup>+</sup>
1. Ableitung des LVP:				
$-dP/dt$ /mmHg/sec):	-1696 $\pm$ 258,5	-3364 $\pm$ 423,5 <sup>+</sup>	-1107 $\pm$ 221,9	-3013 $\pm$ 524,2 <sup>+</sup>
$+dP/dt$ (mmHg/sec):	3000 $\pm$ 432,9	6269 $\pm$ 830,8 <sup>+</sup>	1701 $\pm$ 421,2 <sup>*</sup>	5281 $\pm$ 1061,5 <sup>+</sup>

#### 4.9. Lipopolysaccharid-induzierte Sepsis

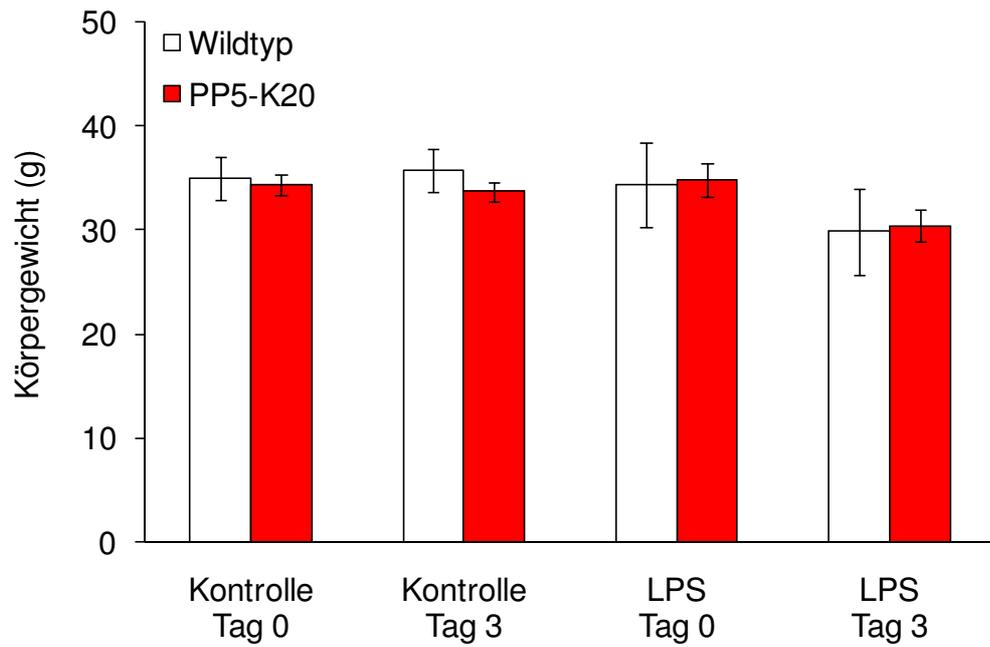
Die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Sepsis ist eine anerkannte Methode und führte hier zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Literatur beschrieben (Müller-Werdan et al., 2006, Sing et al., 2000). Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Tabelle 10 dargestellt. Während unter Kontrollbedingungen das Körpergewicht konstant war, sank es bei LPS-Behandlung leicht (Abbildung 61). Die LPS-Gabe hat die Körpertemperatur nicht verändert (Abbildung 62). Das absolute Milzgewicht stieg durch Behandlung mit LPS bei beiden Genotypen an (Abbildung 63). Das absolute Gewicht der Nieren und der Herzen veränderte sich durch die Behandlung mit LPS nicht (Abbildung 64 und Abbildung 65). Außerdem wurde die Interleukin-6 (IL6)-Konzentration im Blutplasma erfasst. Unter Kontroll-Behandlung war bei beiden Genotypen IL6 unterhalb des Detektionsniveaus. Bei Behandlung mit LPS hatten Wildtyp-Mäuse höhere IL6-Spiegel im Plasma als transgene Tiere (Abbildung 66).

Drei Tage nach LPS-Injektion gab es keine Unterschiede im LVDP zwischen Wildtypen und transgenen Tieren in der Kontroll- und der LPS-Gruppe (Abbildung 67). LPS-behandelte Tiere zeigten aber einen geringeren LVSP als Kontrolltiere. Zudem war der LVSP der mit LPS-behandelten transgenen Tiere höher als bei LPS-behandelten Wildtypen (Abbildung 68). Die Relaxationszeit (Tf10-90) war bei transgenen Kontrolltieren länger als bei Wildtypen. Durch LPS wurde die Relaxationszeit nur bei Wildtypen verlängert, aber nicht bei transgenen Tieren (Abbildung 69).

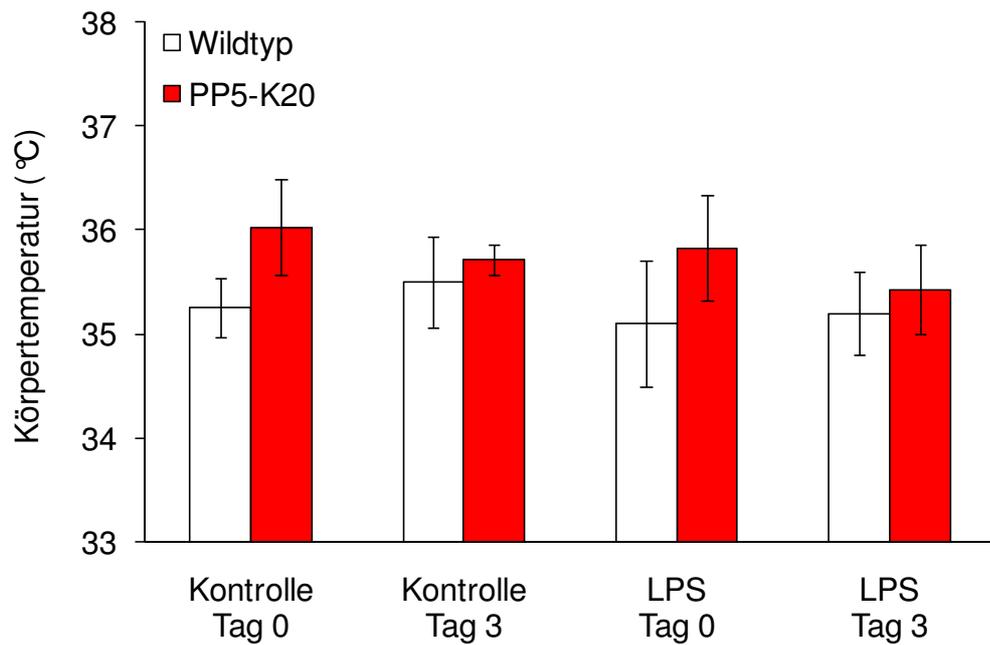
Es gab keine Unterschiede im systolischen und diastolischen Druck des linken Vorhofs zwischen Wildtypen und transgenen Tieren und zwischen LPS- und Kontroll-Tieren (Abbildung 70 und Abbildung 71).

Transgene Tiere zeigten unter Kontrollbedingungen eine geringere Herzfrequenz als Wildtypen. Im Vergleich zu LPS gab es keine Unterschiede (Abbildung 72).

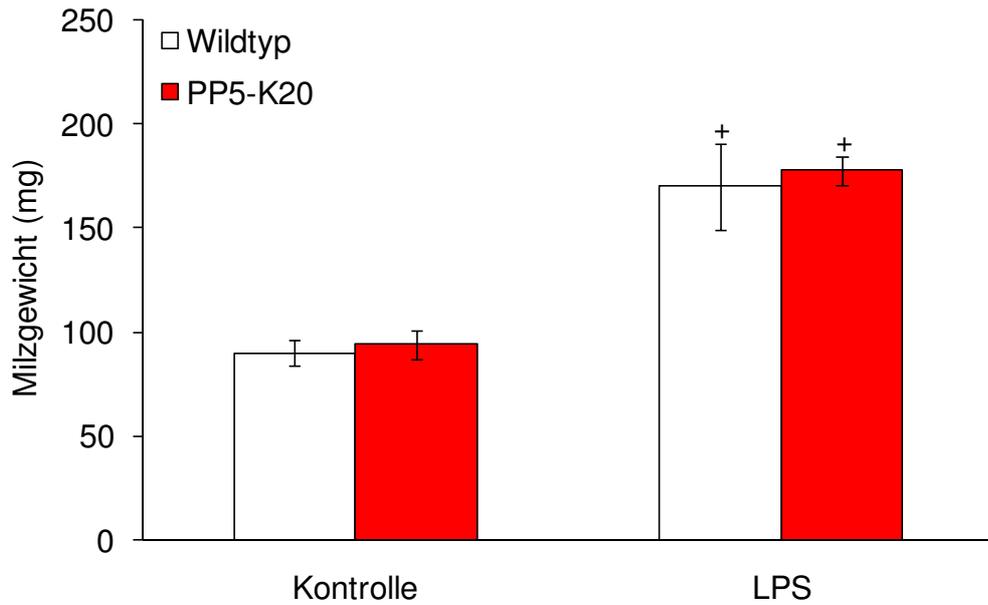
Unter Kontrollbedingungen hatten Herzen transgener Mäuse ein geringeres Maximum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks. Bei Behandlung mit LPS zeigten Herzen transgener Mäuse ein geringeres Minimum und ein geringeres Maximum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks. Bei beiden Genotypen sanken durch LPS-Behandlung die absoluten Werte der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks (Abbildung 73 und Abbildung 74).



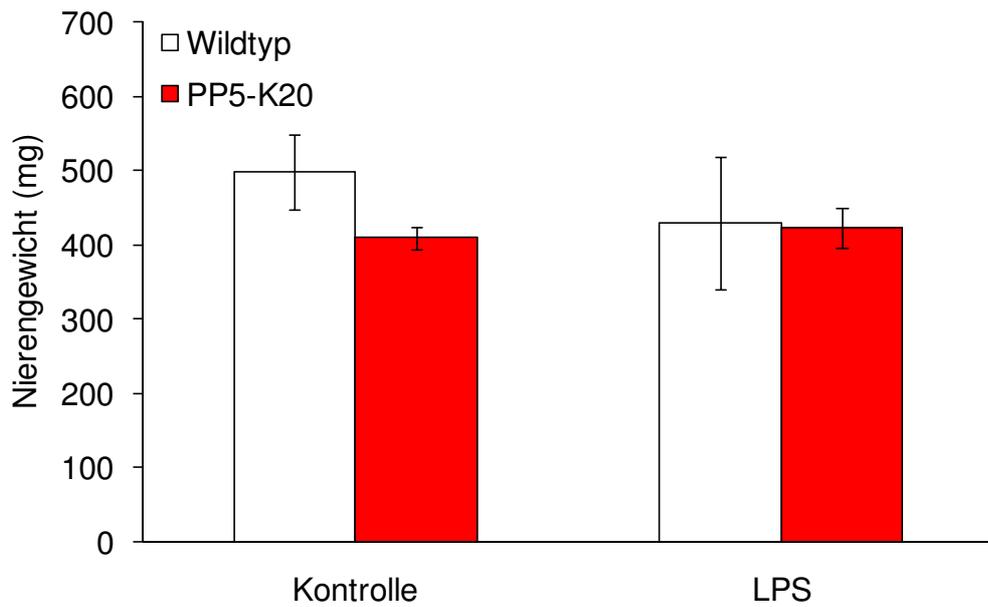
**Abbildung 61: Körpergewicht am Tag 0 und Tag 3 bei WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).**



**Abbildung 62: Körpertemperatur am Tag 0 und Tag 3 bei WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).**



**Abbildung 63: Milzgewicht bei WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung ( $^+ p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 4 - 7$ ).**



**Abbildung 64: Gewicht der Nieren bei WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung ( $n = 4 - 7$ ).**

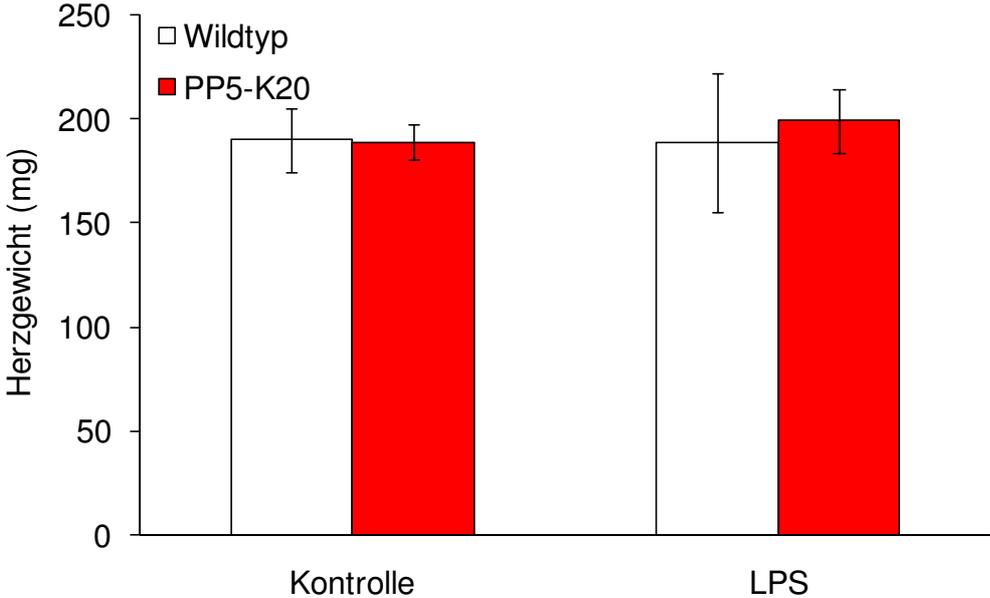


Abbildung 65: Herzgewicht bei WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).

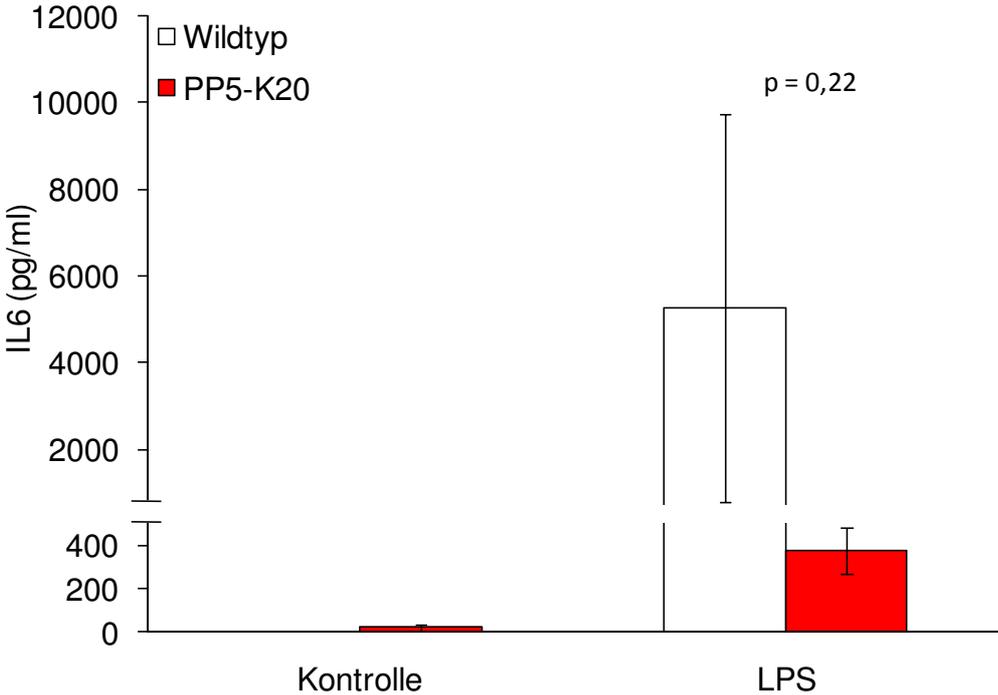
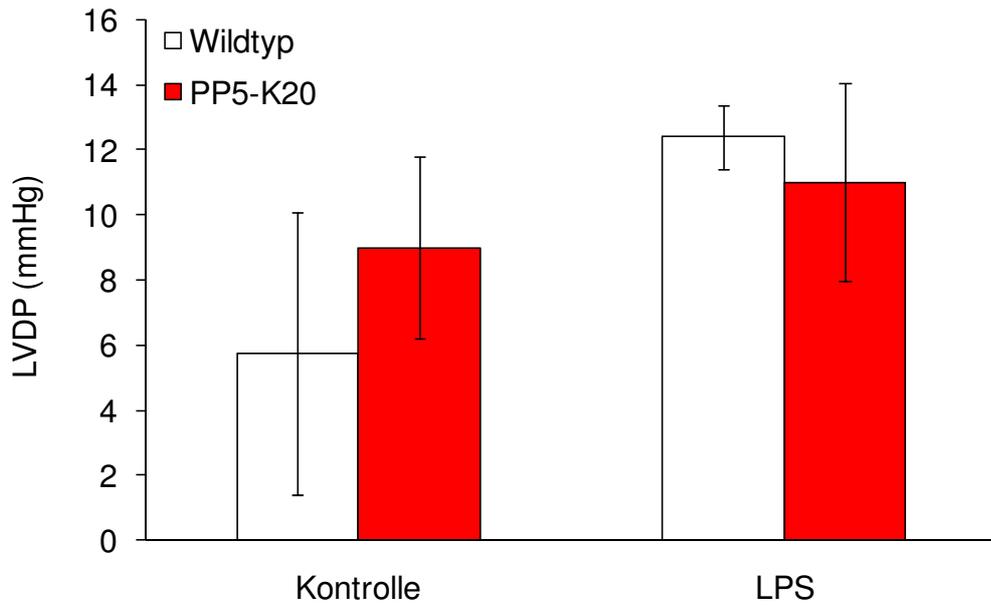
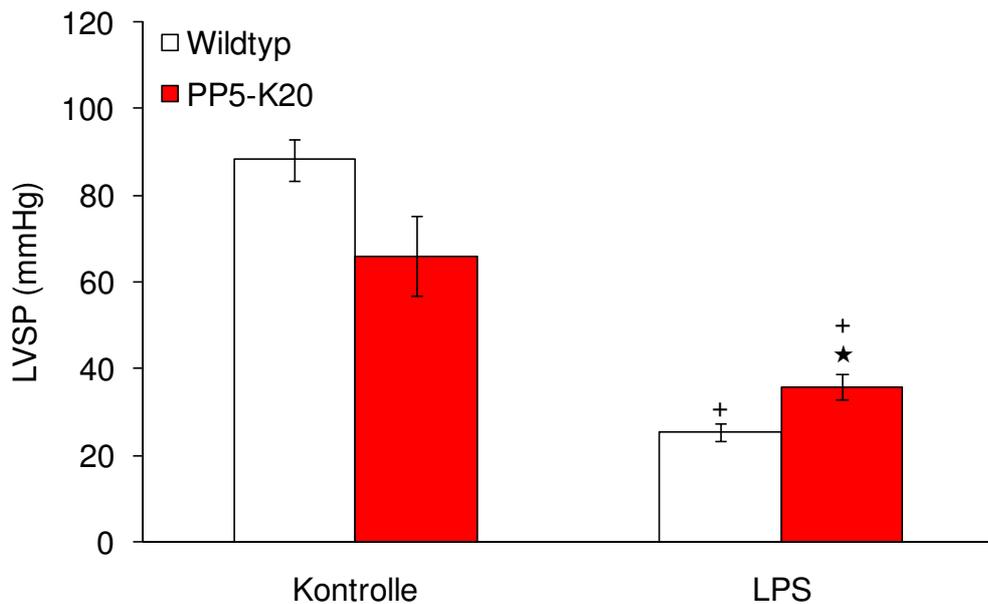


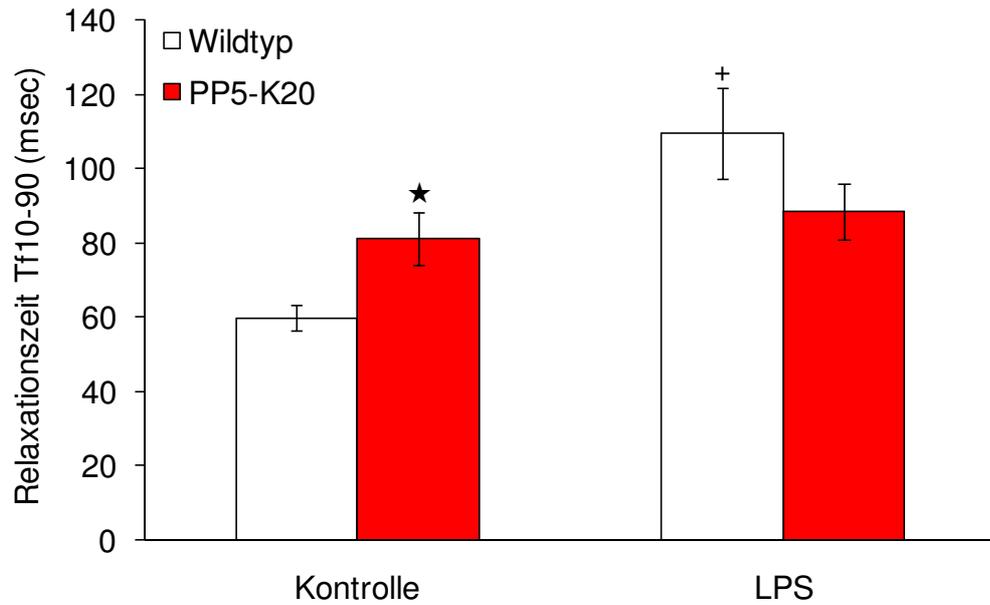
Abbildung 66: IL6-Konzentration im Plasma von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung. Die IL6-Konzentration im Plasma bei Wildtyp Kontrolle lag unter dem Detektionsniveau (n = 4 - 7).



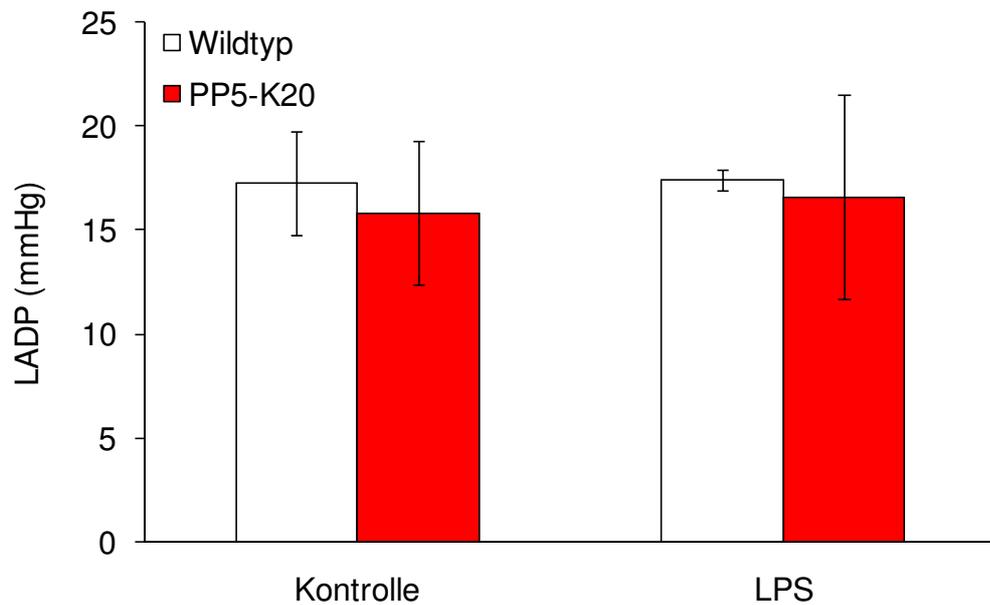
**Abbildung 67: linksventrikulärer diastolischer Druck (LVDP) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).**



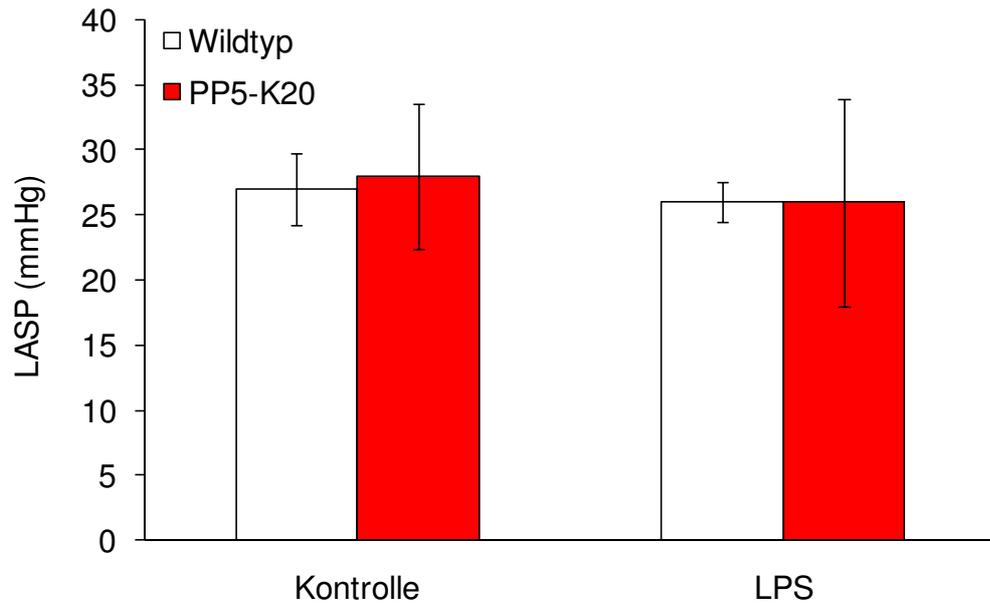
**Abbildung 68: linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (★ p < 0,05 vs. WT, + p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 4 - 7).**



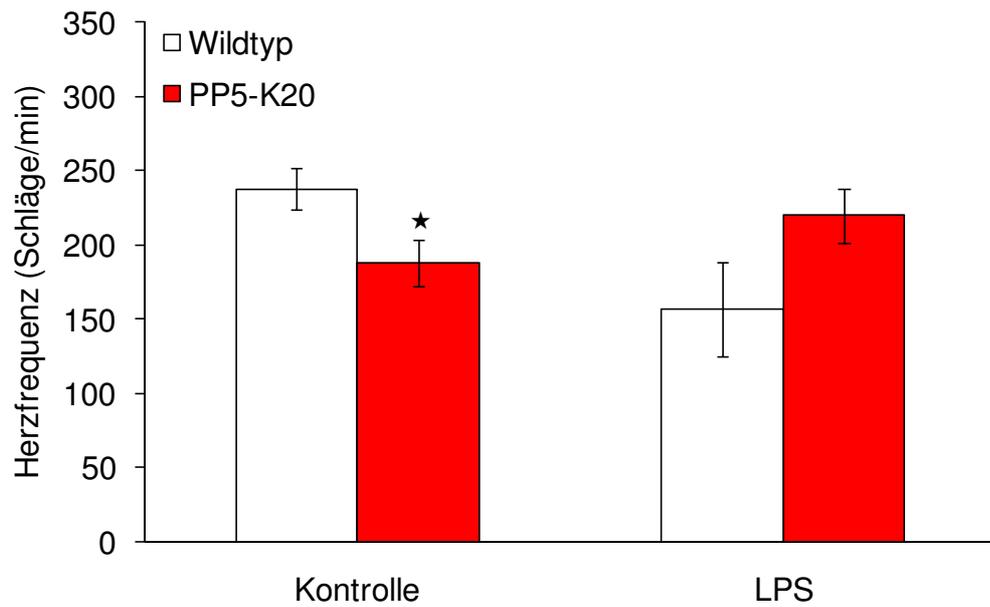
**Abbildung 69: Relaxationszeit Tf10-90 (Zeit von 10 % zu 90 % Relaxation) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (★ p < 0,05 vs. WT, + p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 4 - 7).**



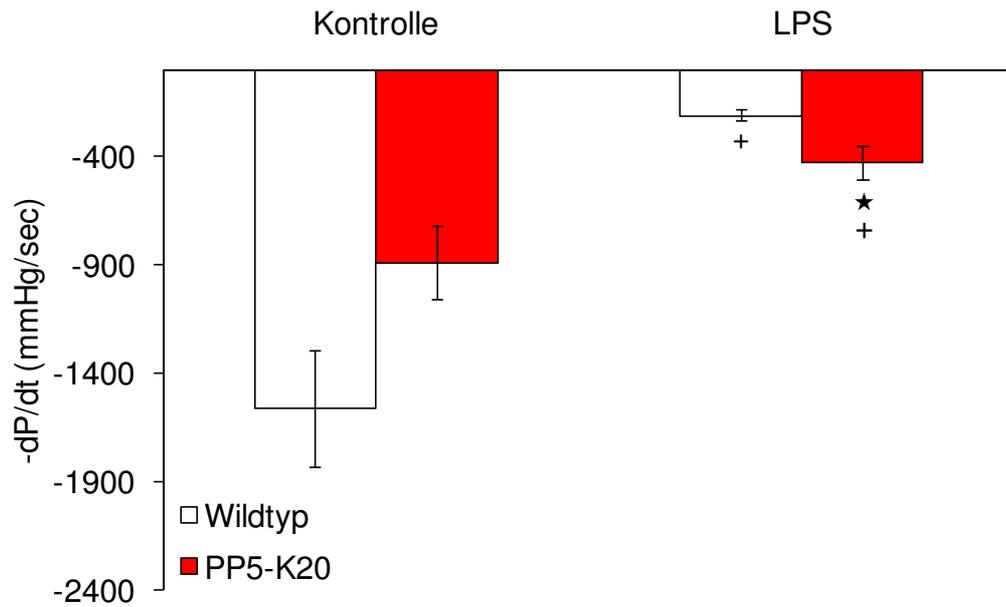
**Abbildung 70: diastolischer Druck des linken Vorhofs (LADP) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).**



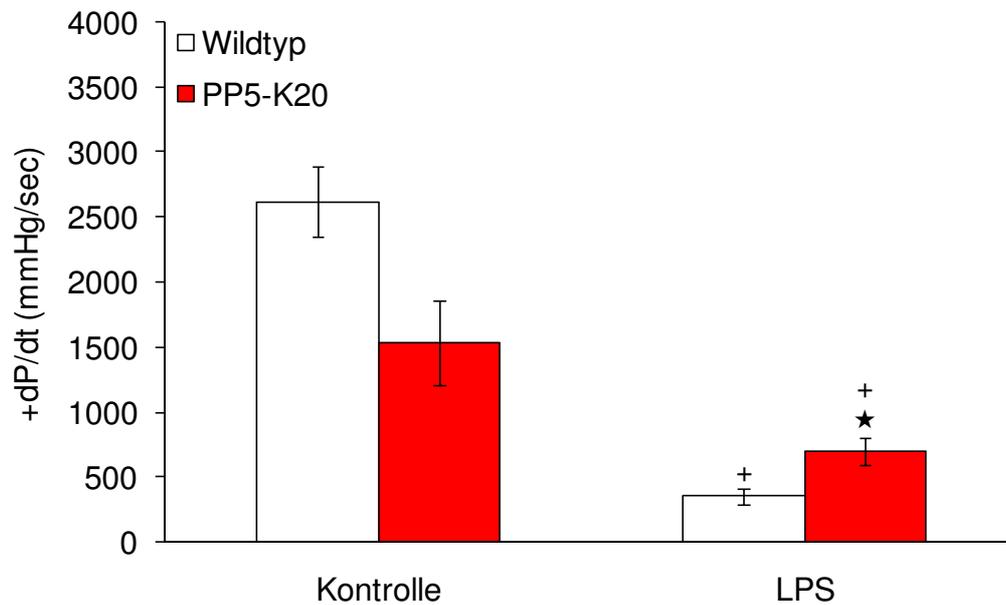
**Abbildung 71: systolischer Druck des linken Vorhofs (LASP) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (n = 4 - 7).**



**Abbildung 72: Herzfrequenz von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (★ p < 0,05 vs. WT, n = 4 - 7).**



**Abbildung 73: Minimum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks (-dP/dt) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (★ p < 0,05 vs. WT, + p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 4 - 7).**



**Abbildung 74: Maximum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks (+dP/dt) in Herzen von WT und PP5-K20 nach LPS- oder Kontroll-Behandlung (★ p < 0,05 vs. WT, + p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 4 - 7).**

**Tabelle 10: Zusammenfassung der LPS-Versuche (\* p < 0,05 vs. WT, + p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 4 - 7).**

Bedingung:	Wildtyp		PP5-K20	
	Kontrolle	LPS	Kontrolle	LPS
Parameter:	Mittelwert ± SEM	Mittelwert ± SEM	Mittelwert ± SEM	Mittelwert ± SEM
Körpergewicht (g):				
Tag 0:	35 ± 2,1	34 ± 4,1	34 ± 1,0	35 ± 1,6
Tag 3:	36 ± 2,0	30 ± 4,2	34 ± 0,9	30 ± 1,5
Körpertemperatur (°C):				
Tag 0:	35 ± 0,3	35 ± 0,6	36 ± 0,5	36 ± 0,5
Tag 3:	36 ± 0,4	35 ± 0,4	36 ± 0,1	35 ± 0,4
Milzgewicht (mg):	90 ± 6,1	170 ± 20,9 <sup>+</sup>	94 ± 6,9	178 ± 6,9 <sup>+</sup>
Nierengewicht (mg):	498 ± 50,2	429 ± 88,9	409 ± 15,3	423 ± 26,7
Herzgewicht (mg):	190 ± 15,5	189 ± 33,4	189 ± 8,2	199 ± 15,4
IL6-Plasmaspiegel (pg/ml):	1 ± 1,0	2651 ± 1302,0	12 ± 2,8	119 ± 86,7
LVDP (mmHg):	6 ± 4,3	12 ± 1,0	9 ± 2,8	11 ± 3,0
LVSP (mmHg):	88 ± 4,9	25 ± 2,0 <sup>+</sup>	66 ± 9,3	36 ± 2,9 <sup>★+</sup>
Relaxationszeit Tf10-90 (msec):	60 ± 3,4	110 ± 12,2 <sup>+</sup>	81 ± 7,2 <sup>★</sup>	89 ± 7,4
LADP (mmHg):	17 ± 2,5	17 ± 0,5	16 ± 3,4	17 ± 4,9
LASP (mmHg):	27 ± 2,7	26 ± 1,5	28 ± 5,6	26 ± 8,0
Herzfrequenz (Schläge/Minute):	238 ± 13,5	157 ± 31,7	188 ± 15,6 <sup>★</sup>	220 ± 18,4
-dP/dt (mmHg/sec):	-1564 ± 268,6	-211 ± 25,6 <sup>+</sup>	-892 ± 170,2	-428 ± 79,6 <sup>★+</sup>
+dP/dt (mmHg/sec):	2617 ± 271,1	351 ± 63,5 <sup>+</sup>	1533 ± 321,7	699 ± 105,5 <sup>★+</sup>

## 5. Diskussion

### 5.1. potentielle Substrate der PP5 im Herzen

Wie in der Einleitung beschrieben und in den Ergebnissen gezeigt, ist Phospho-Casein ein Substrat der PP5. Der Caseinassay wurde hier als Standard-Phosphatase-Assay benutzt und zeigte eine Stimulierbarkeit der PP5-Aktivität durch Arachidonsäure. Unter Kontrollbedingungen wurde nur wenig Substrat umgesetzt. Ähnlich wie in früheren Untersuchungen wurde eine Hemmung der Arachidonsäure-stimulierten Protein-Phosphatase-Aktivität durch NaF oder Cantharidin gefunden (Chen und Cohen, 1997).

Potentielle Substrate der PP5, die wichtige Bedeutungen im Herzen haben und in bzw. auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisiert sind, sind Phospholamban (PLB, Ser16, Thr17) und Ryanodin-Rezeptoren (Ser2808). An den Myofilamenten lokalisierte potentielle Substrate der PP5 sind Troponin-Inhibitor (TnI, Ser23/24) und Myosin-bindendes Protein C (MBC-C, Ser282, Ser302, Ser273). Kanäle, Pumpen und Rezeptoren, die als potentielle Substrate der PP5 gefunden wurden, sind transiente Auswärtskanäle z.B. Kv4.2<sub>α</sub> (Ser552), β<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptoren (Ser345/346, Ser261/262), Kir2.3-Kanäle (Ser443), Na-K-Pumpe (Ser528), Na<sup>+</sup>H<sup>+</sup>-Austauscher 3 (NHE3, Ser540) und hERG (Ser1140, Ser285). Zytoplasmatische Proteine als potentielle Substrate der PP5 sind Inhibitor-1 (I-1, Thr35), EF2-Kinase (Ser499), BAD (Ser155) und die regulatorische (inhibitorische) Untereinheit 9B der PP1 (PPP1R9B, Ser94). An bzw. in der Membran lokalisierte Proteine als potentielle Substrate der PP5 sind Phosphodiesterase 3B (PDE3B, Ser10), Phospholipase γ1 (PLC-γ1, Ser1248) und Phospholemman (PLM, Ser88). Transkriptionsfaktoren als potentielle Substrate der PP5 sind cAMP-responsives Element Modulator (CREMt, Ser113), cAMP responsives Element-Bindungsprotein (CREB, Ser133).

#### **potentielle Substrate der PP5 auf bzw. in Membran des SR:**

Phosphorylierung von PLB erhöht die Aktivität von SERCA. Mehr Ca<sup>2+</sup> wird in das SR gepumpt und akkumuliert dort, wodurch beim nächsten Zyklus mehr Ca<sup>2+</sup> für die Kontraktion zur Verfügung gestellt werden kann. Die Relaxationsrate und die Kontraktilität steigen an. Dephosphorylierung von PLB hemmt SERCA und verringert damit die Relaxationsrate und die Kontraktilität (Brittsan und Kranias, 2000). Außerdem ist die Phosphorylierung von Phospholamban nach Isoprenalin-Stimulierung bzw. unter Basalbedingungen in insuffizienten menschlichen Herzen vermindert (Bartel et al., 1996, El-Armouche et al., 2004). Damit könnte PP5 durch Dephosphorylierung die Relaxationsrate und Kontraktilität senken.

Eine mögliche Hyperphosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors (Ser-2808 bzw. Ser-2030) bei Herzfehler wird kontrovers diskutiert (Bers, 2002 und 2006). Einerseits sind transgene Mäuse, bei denen Ser2808 durch Alanin ersetzt wurde, geschützt gegenüber Kardiomyopathie (Phrommintikul und Chattipakorn, 2006, Wehrens et al., 2006) und Marx et al. 2000 zeigten eine Hyperphosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors an Ser-2808 bei Herzfehler und eine damit verbundene erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des Ryanodin-Rezeptors, diastolische Ca<sup>2+</sup>-Lecks, reduzierter Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR und eine kontraktile Dysfunktion, andererseits konnten viele Labore Teilaspekte nicht nachweisen (Bers, 2006). Damit ist nicht klar, inwieweit sich eine mögliche Dephosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors durch PP5 an Ser-2808 auf die Funktion des Rezeptors auswirken könnte. Da bekannt ist, daß PP1 und PP2A an den

Ryanodin-Rezeptor binden können (Lehnart et al., 2004), wäre es von Interesse zu untersuchen, ob auch PP5 im Komplex des Ryanodin-Rezeptors enthalten ist. Allerdings ist der Effekt der Phosphatasen auf die Funktion des Ryanodin-Rezeptors noch nicht geklärt.

#### **an den Myofilamenten lokalisierte potentielle Substrate der PP5:**

Durch Phosphorylierung des TnI sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von Troponin C, die Relaxation wird beschleunigt (Zhang et al., 1995). Da TnI-Dephosphorylierung die Relaxation verlangsamt, könnte sich aktivierte PP5 im Herzen negativ auf die Relaxationsrate und die Kontraktilität auswirken. Zudem ist die Phosphorylierung von TnI nach Isoprenalin-Stimulierung bzw. unter Basalbedingungen bei Kardiomyopathien vermindert (Bartel et al., 1996, Messer et al., 2007, entgegengesetzte Ergebnisse in El-Armouche et al., 2004).

Da Phosphorylierung von MBC-C durch PKA nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung die Kraftentwicklung des Herzens verbessert (Lecarpentier et al., 2008, Nagayama et al., 2007), könnte Dephosphorylierung von MBC-C durch PP5 die Kontraktilität und Herzfunktion sowie die Struktur der dicken Filamente der Myofibrillen und die Interaktion von Myosinköpfen und Aktin/dünnen Filamenten verändern und so zu einer kontraktilen Dysfunktion beitragen (Decker et al., 2005). Hier wurde eine verminderte Kontraktilität und eine abgeschwächte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit bei PP5-überexprimierenden Mäusen gefunden. Die Phosphorylierung von MBC-C ist nach Isoprenalin-Stimulierung bzw. unter Basalbedingungen bei Kardiomyopathien herabgesetzt (Bartel et al., 1996, El-Armouche et al., 2007, Sadayappan et al., 2005).

#### **Kanäle, Pumpen und Rezeptoren als potentielle Substrate der PP5:**

Durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Stimulierung kann  $\text{Kv}4.2_{\alpha}$  reguliert werden (van der Heyden et al., 2006). Bei Herzerkrankungen kann es durch adrenerge Stimulierung zur Phosphorylierung und Herabregulierung des  $\text{Kv}4.2_{\alpha}$ -Kanals kommen (van der Heyden et al., 2006). Durch Dephosphorylierung könnte PP5 der Herabregulierung der Kanäle entgegenwirken.

Neben den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren gibt es im Herzen auch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren (Verhältnis etwa 3:1 beim Mensch). Auch der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor koppelt an  $\text{G}_s$ -Proteine, aktiviert die Adenylylcyclase, erhöht die cAMP-Konzentration und führt somit zur Aktivierung der PKA, die wichtige Proteine des Herzens phosphoryliert. Eine Kopplung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors an  $\text{G}_i$  ist ebenfalls beschrieben. In diesem Komplex kommen außerdem der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC), Caveolin-3, G-Protein  $\text{G}_{\alpha_s}$ , Adenylylcyclase, Proteinkinase A und PP2A vor. Dieser Proteinkomplex befindet sich v. a. in den Caveolae (Balijpalli et al., 2006, Pavoine und Defer, 2005). Bei Kardiomyopathien kommt es zu einer Herabregulierung von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, einer vermehrten Aktivierung von  $\text{G}_{i\alpha}$  und einer Desensitivierung der Adenylylcyclase. Eine Stimulierung der zytosolischen Phospholipase  $\text{A}_2$  (cPLA<sub>2</sub>) führt zur Erhöhung der intrazellulären Arachidonsäurekonzentration. Werden  $\beta$ -Adrenozeptoren durch Katecholamine stimuliert, so steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration, PKA wird aktiviert und phosphoryliert u. a.  $\beta$ -Adrenozeptoren, wodurch diese entkoppelt bzw. desensitiviert und danach internalisiert werden.  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren mit dem  $\text{G}_i/\text{cPLA}_2$ -Signalweg haben eine erhöhte Bedeutung bei Kardiomyopathien (Böhm et al., 1997, Pavoine et al., 2003, Pavoine und Defer, 2005, Pavoine et al., 1999). Durch die freigesetzte Arachidonsäure könnte PP5 aktiviert werden und damit durch Phosphorylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors Einfluss auf dessen Aktivität haben.

Kir2.3-Kanäle im Myokard halten das Ruhemembranpotential aufrecht (Zhu et al., 1999). Da Phosphorylierung und Dephosphorylierung dieses Kanals dessen Aktivität verändern kann, könnte PP5 die Aktivität des Kanals verändern.

Eine Stimulierung der  $\beta$ -Adrenozeptoren durch Isoprenalin reduziert den Strom durch die Na/K-Pumpe (Na-K-H1<sub>a</sub>), dieser Effekt ist durch PKA vermittelt (Gao et al., 1998). Eine PKA-vermittelte Reduzierung des Stroms durch die Na/K-Pumpe (Na-K-H1<sub>a</sub>) kann durch den Phosphatasehemmstoff Calyculin A vermindert werden (Gao et al., 1998). Da PP5 ein Peptid der Na/K-Pumpe dephosphorylieren konnte und da PP5 ebenfalls durch Calyculin A gehemmt wird, könnte sie durch Dephosphorylierung an der Regulation des Kanals beteiligt sein.

hERG ist ein durch PKA bzw. cAMP-erhöhende Substanzen phosphorylierbarer K<sup>+</sup>-Kanal im Herzen, durch die Phosphorylierung sinkt der K<sup>+</sup>-Strom (Cui et al., 2000, Wei et al., 2002). Werden die phosphorylierbaren Reste von hERG wegmutiert, so reagiert der Kanal nicht auf PKA, darüber hinaus können Arrhythmien bei Menschen zum Teil durch Mutationen des hERG erklärt werden. Phosphorylierung durch PKA nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation stimuliert hERG, ein Adaptorprotein (14-3-3 $\epsilon$ ) zu binden, welches den phosphorylierten Zustand stabilisiert und die Aktivierung des Kanals zu hyperpolarisierenden Membranpotentialen verschiebt. Ist hERG z.B. durch Mutationen nicht phosphorylierbar, so wird die Aktivierungsschwelle nicht verändert und verfrühte Aktionspotentiale sind möglich (Choe et al., 2006). Phospho-hERG ist ein potentielles Substrat für PP5, damit könnte diese Phosphatase an der Dephosphorylierung des Kanals beteiligt sein.

#### **potentielle Substrate der PP5 im Zytosol:**

Phosphorylierter I-1 bzw. DARPP-32 hemmt PP1, die Antwort auf  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten wird verstärkt (Endo et al., 1996, Gupta et al., 2002). Durch die Dephosphorylierung des I-1 durch aktivierte PP5 könnte im Herzen die Aktivität der PP1 erhöht und die Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Agonisten abgeschwächt werden. In diesem Zusammenhang ist die hohe Ähnlichkeit der Sequenzen von I-1 und DARPP-32 an den oben genannten Phosphorylierungsstellen zu nennen. Die Phosphorylierung von I-1 ist bei Kardiomyopathien verringert (El-Armouche et al., 2004).

Bei Sauerstoffmangel häufen sich missgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum an und es kommt zur Beendigung der Proteinsynthese (Terai et al., 2005). Dabei wird AMPK in den Herzmuskelzellen aktiviert, die Phosphorylierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) ist erhöht und somit die Proteinsynthese gehemmt, was in diesem Fall kardioprotektiv ist (Terai et al., 2005). Eine Behandlung mit siRNA gegen die EF-2-Kinase führt zur herabgesetzten Phosphorylierung von EF-2 und zum Wegfall der kardioprotektiven Wirkung. AMPK phosphoryliert die EF-2-Kinase direkt und erhöht so die Phosphorylierung von EF-2 (Chan et al., 2004, Terai et al., 2005). Eine Dephosphorylierung der EF-2-Kinase durch PP5 hätte eine verminderte Phosphorylierung von EF-2 zur Folge und könnte zu einer weiteren Proteinsynthese und damit zum Wegfall der kardioprotektiven Wirkung führen.

In Herzmuskelzellen führt eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur Herabregulierung der BAD-Expression und zur Apoptose. Eine Phosphorylierung von BAD an Ser112, Ser136 und Ser155 steigert die anti-apoptotische Wirkung des Proteins. Phosphatasehemmung durch Okadasäure erhöht die Spaltung von BAD. Eine längerdauernde Applikation von Isoprenalin führt über eine Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels und einer Aktivierung der PP2B zur Apoptose,

dabei ist auch die Phosphorylierung von BAD herabgesetzt (Cieslak und Lazou, 2007, Saito et al., 2000, Valks et al., 2002). Da die Dephosphorylierung von BAD die antiapoptotischen Wirkungen dieses Proteins aufhebt, könnte auch PP5 - über eine Dephosphorylierung von BAD - die Apoptose fördern.

PPP1R9B, auch als Spinophilin oder Neurabin II bezeichnet, ist ein Teil des makromolekularen Komplexes des Ryanodin-Rezeptors, jedoch ist die genaue Funktion unbekannt (Bers, 2004, Cohen, 2002). Die Bindung von PPP1R9B an Aktin wird durch eine Phosphorylierung an Ser94 gehemmt (Uematsu et al., 2005). PP5 könnte durch eine Dephosphorylierung von PPP1R9B Einfluss auf die Funktion des Proteins haben.

#### **an bzw. in Membranen lokalisierte Proteine als potentielle Substrate der PP5:**

PDE3B kommt in vielen Zelltypen vor und baut cAMP ab (Palmer et al., 2007). Im Herzen assoziiert sich PDE3B in einem Multiproteinkomplex mit PI3K $\gamma$  und kontrolliert den Abbau von cAMP (Patrucco et al., 2004). Da PP5 ein Peptid der PDE3B dephosphorylieren konnte, könnte PP5 PDE3B dephosphorylieren und inaktivieren.

PLC- $\gamma$ 1 kann in Stressmodellen des Herzens in der Phosphorylierung und Expression erhöht sein und könnte eine Rolle beim Überleben der Herzmuskelzellen spielen (Mangat et al., 2006).

Unter Basalbedingungen hemmt PLM die Na-K-ATPase und senkt deren Affinität für Na<sup>+</sup>. Durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoragonisten wird die Hemmung der Na-K-ATPase durch PLM durch Phosphorylierung von PLM an Ser88 aufgehoben, die Affinität der Na-K-ATPase für Na<sup>+</sup> wird erhöht (Despa et al., 2005). Da PP5 ein Peptid der Na-K-ATPase dephosphorylieren konnte, könnte aktivierte PP5 durch Dephosphorylierung von PLM die Na-K-ATPase hemmen und damit  $\beta$ -adrenerge Effekte abschwächen.

#### **Transkriptionsfaktoren als potentielle Substrate der PP5:**

Phosphorylierung von CREM und CREB beispielsweise nach  $\beta$ -adrenerge Stimulierung kann zur Transkriptionsaktivierung führen (Müller et al., 2005). Somit würde sich eine Dephosphorylierung von CREM durch PP5 negativ auf die Transkriptionsaktivität auswirken. Überexpression einer menschlichen CREM-Form im Herzen von Mäusen führt zur Vergrößerung der Vorhöfe, Vorhof- und Ventrikelhypertrophie, Vorhofflimmern, frühzeitigen Tod und zu einer verminderten Phosphorylierung von CREB (Müller et al., 2005).

Abschließend muß gesagt werden, daß die gefundenen Substrate potentielle Substrate der PP5 sind, da es Peptide und *in vitro*-Versuche waren. Ergänzend müßten Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen als Substrate und beispielsweise Zellkulturversuche, in denen PP5 überexprimiert und experimentell aktiviert wird, durchgeführt werden und es müßte untersucht werden, ob die gefundenen Substrate auch dort Substrate der PP5 sind. Um die Aktivität anderer Protein-Phosphatasen auszuschließen, wären auch Zellkulturversuche mit Knockouts anderer Protein-Phosphatasen, wie beispielsweise PP1, PP2A oder PP2B, wichtig.

## 5.2. potentielle Substrate der PP5 im Vergleich zu denen der PP2C $\beta$

Als Substrat für PP2C $\beta$  ist ebenfalls Casein beschrieben (Klumpp et al., 1998). Im Gegensatz zur PP5 ist die Aktivität von PP2C allerdings abhängig von Mg<sup>2+</sup>, was eine Unterscheidung der Phosphatasen ermöglicht. In den Ergebnissen ist eine Expression im Herzen gezeigt. Somit ist es von Interesse, welche Peptide von PP5 und/oder PP2C dephosphoryliert werden konnten. Teilweise werden die Peptidsubstrate von PP5 und PP2C $\beta$  dephosphoryliert (Kir2.3, PLC- $\gamma$ 1, CREMt,  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor, Kv4.2 $\alpha$ , Na-K-H1 $\alpha$  (Herz), PLB, PLM, PPP1R9B, MBC-C, EF-2-Kinase, TnI und BAD). Einige dieser Substrate haben wichtige Bedeutungen im Herzen (siehe 5.1). Es ist bekannt, daß BAD wichtige Bedeutungen in der Regulation der Apoptose hat. Es ist auch eine Dephosphorylierung von BAD durch PP2C $\alpha$  und PP2C $\beta$  gezeigt worden (Schwarz et al., 2006). Daneben gibt es auch Peptide, die von PP2C $\beta$  besser als von PP5 dephosphoryliert worden sind (Dihydropyridin-sensitiver L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal in Skelettmuskeln (CICC), Inositol 1,4,5-Triphosphat Typ I Rezeptor (IP3R), LTCC, cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE4D3)).

DeSouza et al., 2002 zeigen, daß IP3-Rezeptoren in der Plasmamembran einen makromolekularen Komplex mit PP1, PP2A und PKA bilden und diese Rezeptoren durch PKA-Phosphorylierung aktiviert werden können. Durch eine mögliche Dephosphorylierung des Kanals könnte PP2C $\beta$  Einfluss auf die Aktivität haben.

CICC und L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle sind spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Skelett- bzw. Herzmuskulatur. Durch  $\beta$ -adrenerge Stimulierung nimmt der Strom durch L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle zu. PKA kann die Kanäle direkt phosphorylieren und die Aktivität verändern (Anderson et al., 2006, van der Heyden et al., 2005). Da PP2C $\beta$  auf der Peptidmembran Peptide des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals und des CICC dephosphorylieren konnte, könnte diese Phosphatase eine Rolle bei der Dephosphorylierung und Veränderung der Aktivität der Kanäle haben.

Murthy et al., 2002 zeigen, daß PDE4 in Herzmuskelzellen an der Regulation der Kontraktion beteiligt ist, durch Hydrolyse von cAMP lokal begrenzte Pools der Aktivität von PKA bildet und das Ausmaß der PKA-vermittelten Phosphorylierung von zellulären Proteinen mitbestimmt (Murthy et al., 2002). PP2C $\beta$  könnte an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sein.

## 5.3. Bedeutung der PP5 im Säugetierherz

Die Ergebnisse der Versuche mit dem Modell des „isoliert-perfundierten Arbeit-leistenden Herzens“ zeigen eine negative Abhängigkeit der Herzfunktion vom Ausmaß der Überexpression der PP5 im Herzen. Mäuse der Linie PP5-K20 zeigen eine schlechtere Herzfunktion als Mäuse der Linie PP5-K14 (Gergs et al., 2004b). In den Ergebnissen konnte eine schlechtere Herzfunktion bei transgenen Mäusen der Linie PP5-K20, aber nicht bei transgenen Tieren der Linie PP5-K14, gegenüber Wildtypen gezeigt werden. Transgene Mäuse der Linie PP5-K20 haben unter Basalbedingungen eine geringere Phosphorylierung von PLB an Ser16, aber nicht an Thr17. Durch Versuche mit Peptiden bzw. der Peptidmembran ist PLB als potentielles Substrat der PP5 gefunden worden. Die Bedeutung der PLB-Phosphorylierung wird in 5.1 besprochen. Es gibt keine Veränderung der Expression kontraktile Proteine im Herzen in der PP5-K20-Linie. Eine 2D-Elektrophorese zeigt eine

erhöhte Expression von PP5, Serum-Albumin, ATP-Synthase, Malat-DH, Ethanolamin-Kinase 1, Tropomyosin und drei nicht identifizierbaren Proteinen in den Herzen transgener Tiere. Die Expression der Langketten-spezifischen Acyl-CoA-DH, der  $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins, des eukaryotischen Elongationsfaktor 1  $\epsilon$ 1, der Superoxiddismutase, der Phosphoglycerat-Mutase, der  $\beta$ -Enolase und 9 nicht identifizierbaren Proteinen ist vermindert. In Kardiomyopathie-Modellen sind die Expressionspiegel der ATP-Synthase und des Tropomyosins erhöht (Crabos et al., 1991, Schott et al., 2008). Bei den restlichen Proteinen, deren Expression verändert ist, gibt es in der Literatur bei verschiedenen Kardiomyopathie-Modellen gegensätzliche Ergebnisse (Knecht et al., 1994, Lopes et al., 2006). Die Expression der Phosphoglycerat-Mutase ist in einer durch tachykarde elektrische Reizung („Pacing“) ausgelösten Herzinsuffizienz verändert (Heinke et al., 1999). Die Konzentration der  $\beta$ -Enolase im Serum steigt zwar nach Myokard-Infarkt an, ist aber bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen nicht erhöht (Nomura et al., 1987). Die Bedeutung der Expression der Ethanolamin-Kinase 1, der  $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins und des eukaryotischen Elongationsfaktor 1  $\epsilon$ 1 für die Herzfunktion im gesunden und kranken Herz ist nicht bekannt.

Die Ergebnisse von den Tierlinien und aus 5.1 zeigen einen Einfluss der PP5-Expression und möglicherweise der PP5-Aktivität auf die Herzfunktion und mögliche Substrate im Herzen. Chen und Cohen, 1997 zeigen, daß PP5 durch Arachidonsäure aktiviert werden kann.

Im folgenden Abschnitt werden Signalwege, die zur Freisetzung von Arachidonsäure führen, beschrieben. Freisetzung von Arachidonsäure kann über Stimulierung purinerger und  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren, sowie durch  $\text{TNF}_\alpha$ , Somatostatin, Acetylcholin, Bradykinin, Thrombin, Angiotensin II, Arginin-Vasopressin und Endothelin stimuliert werden. Damit ist eine Aktivierung der PP5 bei diesen Signalwegen vorstellbar. Eine Stimulierung purinerger Rezeptoren des Herzens führt zur Aktivierung der  $\text{cPLA}_2$ , zur Freisetzung von Arachidonsäure und zur Aktivierung des  $\text{K}^+$ -Stroms durch den TREK-Kanal (Aimond et al., 2000). Stimulierung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren führt über ein  $\text{G}_i$ -Protein zur Translokation von  $\text{cPLA}_2$  und Kosedimentierung mit MSK1, eNOS, PLB und SERCA in einer Caveolin-3-angereicherten Membranfraktion und zur Freisetzung von Arachidonsäure (Ait-Mamar et al., 2005). Es wird auch eine Beteiligung der PP5 diskutiert, da diese im Herzen exprimiert, durch Arachidonsäure stimuliert und durch Calyculin A gehemmt wird (Ait-Mamar et al., 2005, Pavoine und Defer, 2005, Pavoine et al., 1999). Zudem kann PP5 mit den G-Proteinen  $\text{G}_{\alpha 12}$  und  $\text{G}_{\alpha 13}$  interagieren, diese aktivieren eine Phospholipase, die Arachidonsäurekonzentration steigt an (Yamaguchi et al., 2002). Bei Stress ausgeschüttetes  $\text{TNF}_\alpha$  führt im Herzen über eine Stimulierung der  $\text{cPLA}_2$  und Arachidonsäurefreisetzung zur Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und der Kontraktion (Amadou et al., 2002). Die Bindung von Somatostatin an den Somatostatin-Rezeptor führt über Aktivierung der  $\text{PLA}_2$  und Arachidonsäurefreisetzung zur Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanals. Die Beteiligung einer Protein-Phosphatase wird vermutet (Duerson et al., 1996). Auch in Herzmuskelzellen sind Somatostatin-Rezeptoren nachgewiesen (Duerson et al., 1996, Smith et al., 2005). Tang et al., 2006 zeigen eine Acetylcholin-abhängige Aktivierung von Phospholipase C, DAG-Lipase und MAG-Lipase und eine Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranlipiden vaskulärer Endothelzellen. Bradykinin aktiviert Bradykinin-2-Rezeptoren und führt zur

Arachidonsäurefreisetzung.  $G_{\alpha i/o}$ -Protein und  $PLA_2$  sind am Signalweg beteiligt (Hecquet et al., 2006). Thrombin führt über  $G_{\alpha 12/13}$  und Rho sowie über  $G_{\alpha q}$ , Phospholipase  $C\beta$  und  $IP_3$  zu einer  $Ca^{2+}$ -abhängigen Arachidonsäurefreisetzung (Hecquet et al., 2006). Thrombin kann in Herzmuskelzellen eine  $Ca^{2+}$ -unabhängige  $PLA_2$  aktivieren und zur Arachidonsäurefreisetzung führen (Beckett et al., 2006). Angiotensin II und Arginin-Vasopressin führen in Herzmuskelzellen über eine Stimulierung der  $PLA_2$  zur Freisetzung von Arachidonsäure (Chen und Chen, 1999, Lokuta et al., 1994). Endothelin führt über Aktivierung einer  $PLA_2$  zur Arachidonsäurefreisetzung (Wu-Wong et al., 1996). Im Herzen kann Arachidonsäure  $K^+$ -Kanäle, Spannungs-gesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle, Ryanodin-Rezeptoren,  $PKC\delta$ ,  $PKC\epsilon$  und  $PKC\zeta$  modulieren (Pavoine und Defer, 2005).

Da einige der potentiellen Substrate der PP5 (PLB, TnI, I-1, MBC-C,  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren) auch wichtige Bedeutungen in der Regulation der Kontraktilität des Herzens haben, könnte unter Bedingungen, bei denen Arachidonsäure freigesetzt wird, eine Dephosphorylierung stattfinden. Eine Phosphorylierung von PLB, TnI, I-1 und MBC-C erhöht die Kontraktilität (Bers, 2002, Brittsan und Kranias, 2000, Lecarpentier et al., 2008). Demnach könnte eine Dephosphorylierung die Kontraktilität senken. Auf diese Weise könnten die Ergebnisse der Versuche mit dem Modell des isolierten perfundierten Herzens der Linien PP5-K20 und PP5-K14 erklärt werden.

Im linken Ventrikel von menschlichem Herzen gibt es keine Unterschiede in der Expression der PP5 zwischen Proben von gesunden Spendern und Patienten mit Herzinsuffizienz. Daraus folgt, daß die Proteinexpression der PP5 im Herzinsuffizienzmodell langfristig nicht verändert ist. Akute Veränderungen während einer Ischämie können nicht ausgeschlossen werden. Im Caseinassay kann Protein-Phosphatase-Aktivität von Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen nachgewiesen werden, allerdings gibt es keine Stimulierung durch Arachidonsäure. Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß Arachidonsäure PP1 hemmen und PP2A und PP5 aktivieren kann (Chen und Cohen, 1997, Herzig und Neumann, 2000), was die fehlende Stimulierbarkeit der Gesamt-Protein-Phosphatase-Aktivität in den menschlichen Herzgewebeproben erklären könnte. Die Protein-Phosphatase-Aktivität ist nur zum Teil durch NaF hemmbar, was auf die Aktivität einer/mehrerer nicht durch NaF hemmbarer Phosphatasen schließen lässt. Zudem zeigen Lubert et al., 2001 eine Interaktion von PP2A und PP5. Es ist nicht klar, inwiefern sich dadurch die Protein-Phosphatase-Aktivitäten der PP2A und PP5 verändern oder ob PP5 andere Phosphatasen aktiviert oder hemmt. Da die Bedeutung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren und von  $G_i$  bei Entwicklung einer Kardiomyopathie zunimmt (Pavoine und Defer, 2005), und da hier z.B. durch  $TNF_\alpha$ , Wasserstoffperoxid und Angiotensin II Arachidonsäure freigesetzt werden (Amadou et al., 2002, Colston et al., 2005, Lokuta et al., 1994), könnte es zu einer Stimulierung der PP5 und zu einer Dephosphorylierung von an der Kontraktion beteiligten Proteinen des Herzens sowie zu einer Verschlechterung der Herzfunktion kommen. Unter Sauerstoffmangel, beispielsweise während einer Ischämie, induziert der Hypoxie-induzierbare Faktor über das Hypoxie-responsive Element die Expression von PP5 und eine Hemmung der Apoptose (Zhou et al., 2004). Damit könnte PP5 eine Rolle bei ischämischen Zuständen des Herzens spielen. Abbildung 75 stellt mögliche Substrate der PP5 und/oder eventuell beeinflusste Signalwege noch einmal schematisch dar.

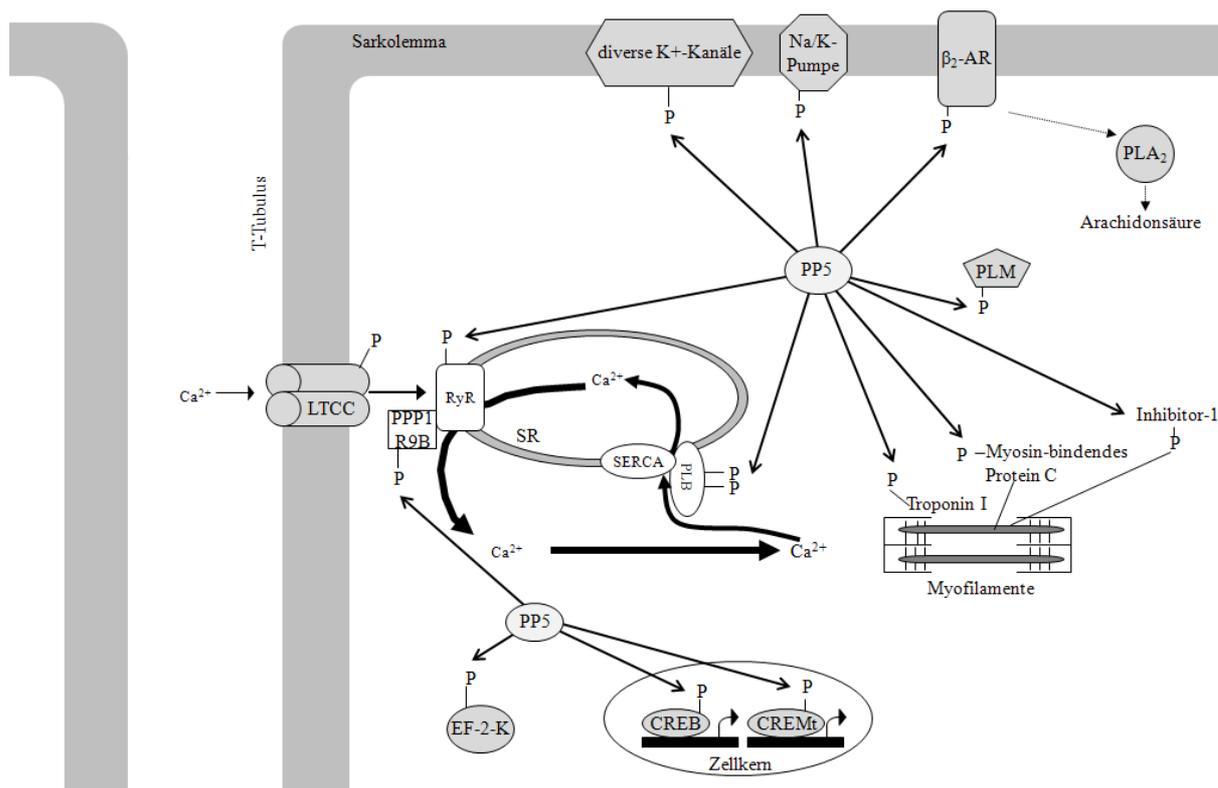


Abbildung 75: Schema der potentiellen Substrate der PP5 im Herzen.

#### 5.4. Bedeutung der PP5 im Säugetierherz unter Belastung/Sepsis

LPS führt zur Aktivierung eines Komplexes aus dem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), CD14 und myeloidem Differenzierungsprotein (MD2). TLR4 wird auch in Herzmuskelzellen exprimiert (de Kleijn und Pasterkamp, 2003). Das Adaptorprotein myeloider Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) bindet an den Komplex und führt zur frühen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und von Mitogen-aktivierten Proteinkinase. Gleichzeitig führt ein MyD88-unabhängiger Signalweg zu einer späten Aktivierung von NF- $\kappa$ B, es werden verschiedene proinflammatorische Mediatoren (z.B. Interleukin-6 (IL6) und TNF $_{\alpha}$ ) produziert und es kommt zur Zellschädigung, was zur Sepsis mit Dysfunktion des Herzens führt (Dauphinee und Karsan, 2006, de Kleijn und Pasterkamp, 2003, Wright et al., 2002). Induktion einer Sepsis reduziert nach 18 Stunden die Phosphorylierung von PLB, die Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Aktivität, die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Myofilamente, die linksventrikuläre Funktion und den cAMP-Gehalt im Herzen (Tavernier et al., 2001, Wu et al., 2002). Der kontraktile Apparat kann im Laufe einer Sepsis zerstört werden (Rossi et al., 2007). Die Aktivität der PLA<sub>2</sub> ist während eines Endotoxin-Schocks erhöht (Wu et al., 1992).

Ähnlich wie oben beschrieben führt eine Behandlung mit Lipopolysacchariden bei Tieren der Linie PP5-K20 zu einer Verschlechterung der Herzfunktion, wobei transgene Tiere nach LPS-Behandlung im Vergleich zu Wildtypen eine bessere Herzfunktion zeigen. Die Organengewichte sind bei Wildtypen und transgenen Tieren ähnlich und bei beiden Genotypen steigt die IL6-Konzentration im Blut an. Allerdings ist die Konzentration des IL6 im Blutplasma transgener Tiere geringer als bei Wildtypen. Im Gegensatz dazu zeigt Gergs et al., 2009 nach Behandlung von Wildtypen und transgenen Tieren der Linie PP5-K20 mit LPS

keine Unterschiede in der IL6-mRNA-Expression, allerdings sind TNF $\alpha$ - und IL6-mRNAs unter Kontrollbedingung in Herzen transgener Tiere niedriger exprimiert als bei Wildtypen der Linie PP5-K20. Dies deutet auf eine mögliche Beeinflussung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch PP5 hin.

Es ist bekannt, daß bei ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie die IL6-Konzentration im Serum/Herzgewebe erhöht ist. Die Höhe der IL6 Spiegel korreliert negativ mit der Herzfunktion (Plenz et al., 2001, entgegengesetzte Ergebnisse bei IL6 Knockout-Mäusen in Fuchs et al., 2003). Bei PP5-K20-Tieren ist die negative Wirkung von LPS schwächer und die Produktion von IL6 geringer als bei Wildtypen. Damit könnte die Überexpression der PP5 einen Einfluss auf die Produktion von IL6 (im Herzen) haben und so protektiv auf die Herzfunktion unter Stressbedingungen wirken. Da unter vielen Stressbedingungen auch Arachidonsäure gebildet wird, könnte in Herzen PP5-überexprimierender Mäuse mehr PP5 aktiviert werden und evtl. auf einen Signalweg, der zur IL6-Expression führt, Einfluss nehmen (Amadou et al., 2002). Es müsste noch untersucht werden, wie sich PP5 auf die Bildung von IL6 auswirkt und ob Substrate oder Interaktionspartner dieser Phosphatase an der Modulation beteiligt sind.

Da bei einer Behandlung mit LPS auch Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert wird (Wu et al., 1992), könnte Arachidonsäure gebildet werden und die Protein-Phosphatase-Aktivität der PP5 stimulieren (Chen und Cohen, 1997). Arachidonsäure (5  $\mu$ M) hemmt den Strom durch mit Isoprenalin stimulierte L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Dieser Effekt kann durch die Protein-Phosphatasehemmstoffe Microcystin (20  $\mu$ M), Okadasäure (25  $\mu$ M) und Calyculin (200 nM) gehemmt werden (Petit-Jacques und Hartzell, 1996). Bei diesen Konzentrationen der Phosphatasehemmstoffe ist auch PP5 gehemmt (Borthwick et al., 2001). L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Zellverkürzung und Ca<sup>2+</sup>-Transienten konnten durch Arachidonsäure (5 bzw. 8,5  $\mu$ M) gehemmt werden (Liu, 2007).

## 6. Zusammenfassung

PP5 ist eine ubiquitär exprimierte, durch Arachidonsäure aktivierbare Protein-Phosphatase, deren physiologische Funktionen weitgehend unbekannt sind. Es sind potentielle Substrate der PP5 im Herz ermittelt und mit einer  $Mg^{2+}$ -abhängigen ebenfalls durch Arachidonsäure stimulierbaren Phosphatase, der  $PP2C_{\beta}$ , verglichen worden. Potentielle Substrate der PP5, die in bzw. auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, sind Phospholamban und Ryanodin-Rezeptor 2. An den Myofilamenten lokalisierte potentielle Substrate der PP5 sind Troponin-Inhibitor und Myosin-bindendes Protein C. Kanäle, Pumpen und Rezeptoren als potentielle Substrate der PP5 sind  $Kv4.2_{\alpha}$ ,  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, Kir2.3,  $Na^+/K^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -Untereinheit, NHE 3, hERG und  $IP_3$ -Rezeptoren. Cytosolische Proteine als potentielle Substrate der PP5 sind Inhibitor-1, DARPP-32, EF-2-Kinase, BAD und PPP1R9B. An bzw. in der Membran lokalisierte Proteine als potentielle Substrate der PP5 sind PDE3B, PLC- $\gamma 1$  und Phospholemman. Transkriptionsfaktoren als potentielle Substrate der PP5 sind CREMt und CREB. Potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$ , die in bzw. auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, sind Phospholamban und Glykogen-bindende Untereinheit der PP1. An den Myofilamenten lokalisierte potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$  sind Troponin-Inhibitor und Myosin-bindendes Protein C. Kanäle, Pumpen und Rezeptoren als potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$  sind L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal,  $IP_3$ -Rezeptoren, Kir2.3,  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren,  $Kv4.2_{\alpha}$ ,  $Na^+/K^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -Untereinheit, spannungsregulierter  $Na^+$ -Kanal (Herztyp H1)  $\alpha$ -Untereinheit, Kir2.1 und NHE3. Cytosolische Proteine als potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$  sind EF-2-Kinase, BAD und PPP1R9B. An bzw. in der Membran lokalisierte Proteine als potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$  sind PDE3B, PDE4D3, PLC- $\beta 3$ , PLC- $\gamma 1$  und Phospholemman. Transkriptionsfaktoren als potentielle Substrate der  $PP2C_{\beta}$  sind CREMt und CREB. Die Bedeutung der PP5 im Säugetierherzen ist an einer transgenen Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression der PP5 untersucht worden. Das relative Herzgewicht ist bei transgenen Tieren leicht erhöht, die Expression von  $Ca^{2+}$ -regulatorischen Proteinen des sarkoplasmatischen Retikulums unverändert. Die Expression von PP5, Serum-Albumin, ATP-Synthase, Malat-DH und Tropomyosin ist erhöht und die Expression der Langketten-spezifischen Acyl-CoA-DH und der Superoxiddismutase ist vermindert. Im Modell des isolierten perfundierten Herzens haben Herzen transgener Tiere unter Kontrollbedingungen einen höheren diastolischen und niedrigeren systolischen linksventrikulären Druck, eine verlängerte Relaxationszeit, eine niedrigere Herzfrequenz und niedrigere Absolutwerte der Extrema der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks als Herzen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. In Herzen transgener Tiere ist unter maximaler  $\beta$ -adrenerger Stimulierung die Relaxationszeit länger, die Herzfrequenz und die Absolutwerte der Extrema der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks niedriger als in Herzen von Wildtyp-Tieren. Unter Kontrollbedingungen ist die Phosphorylierung von PLB an Ser16, aber nicht an Thr17, in Herzen transgener Tiere geringer als in Herzen von Wildtypen. Vergleichend ist die Herzfunktion einer Mauslinie mit schwächerer Überexpression der PP5 untersucht worden (PP5-K14), hier gibt es abgesehen vom Maximum der 1. Ableitung des linksventrikulären Drucks unter Kontrollbedingungen keine Unterschiede zwischen den Genotypen unter Basalbedingungen oder nach  $\beta$ -adrenerger

Stimulierung. Behandlung von isolierten Herzmuskelzellen mit Isoprenalin zeigt keine Unterschiede in der Phosphorylierung von PLB und Troponin-Inhibitor zwischen Wildtypen und transgenen Zellen (PP5-K20). Induktion einer Sepsis mit LPS vermindert die Herzfunktion bei transgenen und Wildtyp-Mäusen. Dieser Effekt ist bei Wildtypen jedoch deutlich ausgeprägter als bei transgenen Tieren (PP5-K20). Das relative und absolute Milzgewicht ist bei beiden Genotypen erhöht, aber der IL6-Spiegel ist unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar und nach Behandlung mit LPS bei Wildtypen höher als bei transgenen Tieren. Es gibt keine Unterschiede in der PP5-Proteinexpression in linken Ventrikeln herzgesunder und herzkranker Menschen.

## 7. Literatur

- Aimond F, Rauzier JM, Bony C, Vassort G** (2000) Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K<sup>+</sup> current I<sub>TREK</sub> in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275: 39110-39116
- Ait-Mamar B, Cailleret M, Rucker-Martin C, Bouabdallah A, Candian G, Adamy C, Duvaldestin P, Pecker F, Defer N, Pavoine C** (2005) The cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> pathway, a safeguard of  $\beta_2$ -adrenergic cardiac effects in rats. *J Biol Chem* 280: 18881-18890
- Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, Pavoine C, Pecker P** (2002) Arachidonic acid mediates dual effect of TNF- $\alpha$  on Ca<sup>2+</sup> transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1339-C1347
- Anderson AA, Altafaj X, Zheng Z, Wang ZM, Delbono O, Ronjat M, Treves S, Zorzato F** (2006) The junctional SR protein JP-45 affects the functional expression of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.1. *J Cell Sci* 119: 2145-2155
- Bahl R, Bradley KC, Thompson KJ, Swain RA, Rossie S, Meisel RL** (2001) Localization of protein ser/thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 90: 101-109
- Balijpalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW, Kamp TJ** (2006) Localization of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for  $\beta_2$ -adrenergic regulation. *PNAS* 103: 7500-7505
- Barford D, Das AK, Egloff MP** (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 133-164
- Bartel S, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H** (1996) Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem* 157: 171-179
- Bartel S, Vetter D, Schlegel WP, Wallukat G, Krause EG, Karczewski P** (2000) Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 in the absence and presence of  $\beta$ -adrenergic stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2173-2185
- Bastians H, Ponstingl H** (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J Cell Sci* 109: 2865-2874
- Beaufils S, Grossmann JG, Renault A, Bolanos-Garcia VM** (2008) Characterization of the tetratricopeptide-containing domain of BUB1, BUBR1, and PP5 proves that domain amphiphilicity over amino acid sequence specificity governs protein adsorption and interfacial activity. *J Phys Chem B* 112: 7984-7991
- Becker W, Kentrup H, Klumpp S, Schultz JE, Joost HG** (1994) Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* 269: 22586-22592
- Beckett CS, Pennington K, McHowat J** (2006) Activation of MAPKs in thrombin-stimulated ventricular myocytes is dependent on Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub>. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1350-C1354

- Bers DM** (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
- Bers DM** (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37: 417-429
- Bers DM** (2006) Cardiac ryanodine receptor phosphorylation: target sites and functional consequences. *Biochem J* 396: e1-e3
- Bilchick K, Duncan JG, Ravi R, Takimoto E, Champion HC, Gao WD, Stull LB, Kass DA, Murphy AM** (2007) Heart failure-associated alterations in troponin I phosphorylation impair ventricular relaxation-afterload and force-frequency responses and systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H318-H325
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
- Blatch GL, Lässle M** (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* 21: 932-939
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A** (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 115: 3306-3317
- Böhm M, Flesch M, Schnabel P** (1997) Beta-adrenergic signal transduction in the failing and hypertrophied myocardium. *J Mol Med* 75: 842-848
- Borthwick EB, Zeke T, Prescott AR, Cohen PTW** (2001) Nuclear localization of protein phosphatase 5 is dependent on the carboxy-terminal region. *FEBS Letters* 491: 279-284
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brewis ND, Street AJ, Prescott AR, Cohen PTW** (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J* 12: 987-996
- Brittsan AG, Kranias EG** (2000) Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2131-2139
- Brown L, Borthwick EB, Cohen PTW** (2000) Drosophila protein phosphatase 5 is encoded by a single gene that is most highly expressed during embryonic development. *Biochim Biophys Acta* 1492: 470-476
- Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG, Dyck JR** (2004) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279: 32771-32779
- Chen MX, Cohen PTW** (1997) Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Letters* 400: 136-140
- Chen MX, McPartlin AE, Brown L, Chen YH, Barker HM, Cohen PT** (1994) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J* 13: 4278-4290
- Chen MS, Silverstein AM, Pratt WB, Chinkers M** (1996) The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 271: 32315-32320

- Chen WC, Chen CC** (1999) Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of  $\text{Ca}^{2+}$  and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 140: 1639-1648
- Chinkers M** (1994) Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *PNAS* 91: 11075-11079
- Chinkers M** (1997) Mapping Pp5c, the gene encoding protein phosphatase 5, to mouse Chromosome 7. *Mammalian Genome* 8: 538-539
- Choe CU, Schulze-Bahr E, Neu A, Xu J, Zhu ZI, Sauter K, Bähring R, Priori S, Guicheney P, Mönnig G, Neapolitano C, Heidemann J, Clancy CE, Pongs O, Isbrandt D** (2006) C-terminal H-ERG (LQT2) mutations disrupt IKr channel regulation through 14-3-3epsilon. *Hum Mol Genet* 15: 2888-2902
- Cieslak D, Lazou A** (2007) Regulation of BAD protein by PKA, PKCdelta and phosphatases in adult rat cardiac myocytes subjected to oxidative stress. *Mol Cells* 24: 224-231
- Cohen P** (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 268: 5001-5010
- Cohen PTW** (2002) Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256
- Cohen PTW** (2004) Overview of protein serine/threonine phosphatases. In: Arino J, Alexander DR (Hrsg.) *Protein phosphatases. Topics in Current Genetics* 5. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Seiten 1-20
- Colston JT, de la Rosa SD, Strader JR, Anderson MA, Freeman GL** (2005)  $\text{H}_2\text{O}_2$  activates nox4 through  $\text{PLA}_2$ -dependent arachidonic acid production in adult cardiac fibroblasts. *FEBS L* 579: 2533-2540
- Conde R, Xavier J, McLoughlin C, Chinkers M, Ovsenek N** (2005) Protein phosphatase 5 is a negative modulator of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 280: 28989-28996
- Crabos M, Yamakado T, Heizmann CW, Cerletti N, Bühler FR, Erne P** (1991) The calcium binding protein tropomyosin in human platelets and cardiac tissue: elevation in hypertensive cardiac hypertrophy. *Eur J Clin Invest* 21: 472-478
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV** (2000) Cyclic AMP regulates the H-ERG  $\text{K}^+$  channel by dual pathways. *Curr Biol* 10: 671-674
- D'Andrea LD, Regan L** (2003) TPR proteins: the versatile helix; *Trends in Biochemical Sciences*. 28: 655-662
- Das AK, Cohen PTW, Barford D** (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17: 1192-1199
- Dauphinee SM, Karsan A** (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86: 9-22
- de Kleijn D, Pasterkamp G** (2003) Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 60: 58-67
- Decker RS, Decker ML, Kulikovskaya I, Nakamura S, Lee DC, Harris K, Klocke FJ, Winegrad S** (2005) Myosin-binding protein C phosphorylation, myofibril structure, and contractile function during low-flow ischemia. *Circulation* 111: 906-912

- DeSouza N, Reiken S, Ondrias K, Yang YM, Matkovich S, Marks AR** (2002) Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem* 277: 39397-39400
- Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia L, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM** (2005) Phospholemman-phosphorylation mediates the  $\beta$ -adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res* 97: 252-259
- duBell WH, Rogers TB** (2004) Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in mouse cardiac myocytes. *J Physiol* 556: 79-93
- Duerson K, White RE, Jiang F, Schonbrunn A, Armstrong DL** (1996) Somatostatin stimulates  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels in rat pituitary tumor cells through lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Neuropharmacology* 35: 949-961
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T** (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 700-706
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T** (2004) Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 61: 87-93
- El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L** (2007) Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 43: 223-229
- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S** (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35: 5220-5228
- Frank R, Overwin H** (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 66: 149-169
- Fu Z, Larson KA, Chitta RK, Parker SA, Turk BE, Lawrence MW, Kaldis P, Galaktionov K, Cohn SM, Shabanowitz J, Hunt DF, Sturgill TW** (2006) Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase. *Mol Cell Biol* 26: 8639-8654
- Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, Schieffer B, Rose-John S, Drexler H** (2003) Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 17: 2118-2120
- Fukuda H, Shima H, Vesonder RF, Tokuda H, Nishino H, Katoh S, Tamura S, Sugimura T, Nagao M** (1996) Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 160-165
- Fukuda H, Tsuchiya N, Hara-Fujita K, Takagi S, Nagao M, Nakagama H** (2007) Induction of abnormal nuclear shapes in two distinct modes by overexpression of serine/threonine protein phosphatase 5 in HeLa cells. *J Cell Biochem* 101: 321-330
- Galigniana MD, Harrell JM, Murphy PJM, Chinkers M, Radanyi C, Renoir JM, Zhang M, Pratt WB** (2002) Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic

- dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidyl-prolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* 41: 13602-13610
- Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, Ljungman M, Pratt WB** (2004) Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to nucleus. *J Biol Chem* 279: 22483-22489
- Gallo LI, Ghini AA, Pilipuk GP, Galigniana MD** (2007) Differential recruitment of tetratricopeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent tetrotransport and hormone-dependent transcriptional activity. *Biochemistry* 46: 14044-14057
- Gao J, Cohen IS, Mathias RT, Baldo GJ** (1998) The inhibitory effect of beta-stimulation on the Na/K pump current in guinea pig ventricular myocytes is mediated by a cAMP-dependent pathway. *Pflugers Arch* 435: 479-484
- Gao T, Yatani A, Dell'Aqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM** (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* 19: 185-196
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J** (2004a) Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem* 279: 40827-40834
- Gergs U, Fabritz L, Buchwalow I, Schmitz W, Neumann J** (2004b) Impaired ventricular contractility in transgenic mice overexpressing the protein phosphatase 5 in the heart. *Z Kardiol* 93 (Suppl 3): 1
- Gergs U, Werner F, Großmann C, Schreier B, Gekle M, Loppnow H, Neumann J** (2009) Involvement of PP5 in cardiac response to LPS induced sepsis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379 (Suppl. 1): 263
- Golden T, Aragon IV, Rutland B, Tucker JA, Shevde LA, Samant RS, Zhou G, Amable L, Skarra D, Honkanen RE** (2008a) Elevated levels of ser/thr protein phosphatase 5 (PP5) in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1782: 259-270
- Golden T, Swingle M, Honkanen RE** (2008b) The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27: 169-178
- Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K** (2004) Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem* 88: 298-310
- Grupp IL, Grupp G, Sfyris G** (1998) The isolated work-performing mouse heart preparation – comparison and quantification of cardiac performance in transgenic and wild-type mice. In: Hoit BD, Walsh RA *Cardiovascular Physiology in the Genetically Engineered Mouse*. Kluwer Academic Publishers Norwell, MA, Seiten 77-95
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J** (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185
- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Sabbah HN** (2002) Inhibition of type 1 protein phosphatase activity by activation of  $\beta$ -adrenoceptors in ventricular myocardium. *Biochem Pharmacol* 63: 1069-1076

- Hahn JS** (2005) Regulation of nod1 by hsp90 chaperone complex. *FEBS Letters* 579: 4513-4519
- Hall DD, Feekes JA, Arachchige Don AS, Shi M, Hamid J, Chen L, Strack S, Zamponi GW, Horne MC, Hell JW** (2006) Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to ser<sup>1928</sup>, its main PKA site, is critical for ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry* 45: 3448-3459
- Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, Ikeda S, Wang H, Katsura K, Yanagawa Y, Hiraga A, Kanamaru R, Tamura S** (1998) Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Letters* 437: 172-176
- Hanada M, Ninomiya-Tsuji J, Komaki K, Ohnishi M, Katsura K, Kanamaru R, Matsumoto K, Tamura S** (2001) Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 276: 5753-5759
- Hecquet C, Biyashev D, Tan F, Erdos EG** (2006) Positive cooperativity between the thrombin and bradykinin B2 receptors enhances arachidonic acid release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H948-H958
- Heinke MY, Wheeler CH, Yan JX, Amin V, Chang D, Einstein R, Dunn MJ, dos Remedios CG** (1999) Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis* 20: 2086-2093
- Herzig S, Neumann J** (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210
- Hinds TD, Sanchez ER** (2008) Protein phosphatase 5. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2358-2362
- Hishiya A, Ohnishi M, Tamura S, Nakamura F** (1999) Protein phosphatase 2C inactivates F-actin binding of human platelet moesin. *J Biol Chem* 274: 26705-26712
- Honkanen RE, Golden T** (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?. *Curr Med Chem* 9: 2055-2075
- Huang S, Shu L, Easton J, Harwood FC, Germain GS, Ichijo H, Houghton PJ** (2004) Inhibition of rapamycin activates apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling by suppressing protein phosphatase 5 activity. *J Biol Chem* 279: 36490-36496
- Huang X, Honkanen RE** (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *J Biol Chem* 273: 1462-1468
- Hufnagel B, Dworak M, Soufi M, Mester Z, Zhu Y, Schaefer JR, Klumpp S, Krieglstein J** (2005) Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2C $\beta$  and induce apoptosis in endothelial cells. *Arteriosclerosis* 180: 245-254
- Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S** (2005) Protein Phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18: 1131-1143
- Jeong JY, Johns J, Sinclair C, Park JM, Rossie S** (2003) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein ser/thr phosphatase TI and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC Cell Biology* 4: 3-16

- Jones LR, Simmerman HK, Wilson WW, Gurd FR, Wegener AD** (1985) Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 260: 7721-7730
- Kaldis P, Cheng A, Solomon MJ** (2000) The effects of changing the site of activating phosphorylation in CDK2 from threonine to serine. *J Biol Chem* 275: 32578-32584
- Kang H, Sayner SL, Gross KL, Russell LC, Chinkers M** (2001) Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry* 40: 10485-10490
- Kincaid RL, Giri PR, Higuchi S, Tamura J, Dixon SC, Marietta CA, Amorese DA, Martin BM** (1990) Cloning and characterization of molecular isoforms of the catalytic subunit of Calcineurin using nonisotopic methods. *J Biol Chem* 265: 11312-11319
- Klumpp S, Selke D, Hermesmeier J** (1998) Protein phosphatase type 2C active at physiological  $Mg^{2+}$ : stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437: 229-232
- Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Pleissner KP, Jungblut P, Steffen C, Hildebrandt A, Fleck E** (1994) Characterization of myocardial protein composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur Heart J* 15 (Suppl D): 37-44
- Kono Y, Maeda K, Kuwahara K, Yamamoto H, Miyamoto E, Yonezawa K, Takagi K, Sakaguchi N** (2002) MCM3-binding GANP DNA-primase is associated with a novel phosphatase component G5PR. *Genes Cell* 7: 821-834
- Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG, Bartel S** (1999) Ser<sup>16</sup> prevails over thr<sup>17</sup> phospholamban phosphorylation in the  $\beta$ -adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol* 276: H1625-H1633
- Kutuzov MA, Andreeva AV, Voyno-Yasenetskaya TA** (2005) Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by polyamine levels via protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 280: 25388-25395
- Lecarpentier Y, Vignier N, Oliviero P, Guellich A, Carrier L, Coirault C** (2008) Cardiac myosin-binding protein C modulates the tuning of the molecular motor in the heart. *Biophys J* 95: 720-728
- Lehnart SE, Wehrens XHT, Marks AR** (2004) Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1267-1279
- Lifschitz-Mercer B, Sheinin Y, Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI, Lavi S** (2001) Protein phosphatase 2C $\alpha$  expression in normal human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 116: 31-39
- Liu F, Khawaja X** (2005) Basal adrenocorticotropin (ACTH) secretion is negatively modulated by protein phosphatase 5 in mouse pituitary corticotrophin AtT20 cells. *Regul Pept* 127: 191-196
- Liu SJ** (2007) Inhibition of L-type  $Ca^{2+}$  channel current and negative inotropy induced by arachidonic acid in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1594-C1604
- Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB** (1994) Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart. *J Biol Chem* 269: 4832-4838

- Lopes R, Solter PF, Sisson DD, Oyama MA, Prosek R** (2006) Characterization of canine mitochondrial protein expression in natural and induced forms of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 67: 963-970
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lubert EJ, Hong Y, Sarge KD** (2001) Interaction between protein phosphatase 5 and the A subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a heterotrimeric form of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 276: 38582-38587
- Lüss H, Klein-Wiele O, Boknik P, Herzig S, Knapp J, Linck B, Müller FU, Scheld HH, Schmid C, Schmitz W, Neumann J** (2000) Regional expression of protein phosphatase type 1 and 2A catalytic subunit isoforms in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2349-2359
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P** (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196: 725-734
- MacLennan DH, Kranias EG** (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews* 4: 566-577
- Mangat R, Singal T, Dhalla NS, Tappia PS** (2006) Inhibition of phospholipase C-gamma 1 augments the decrease in cardiomyocyte viability by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H854-H860
- Marley AE, Kline A, Crabtree G, Sullivan JE, Beri RK** (1998) The cloning expression and tissue distribution of human PP2C $\beta$ . *FEBS Lett* 431: 121-124
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, Marks AR** (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-376
- McGowan CH, Cohen P** (1988) Protein phosphatase-2C from rabbit skeletal muscle and liver: an Mg<sup>2+</sup>-dependent enzyme. *Methods Enzymol* 159: 416-426
- Messer AE, Jacques AM, Marston SB** (2007) Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42: 247-259
- Müller FU, Lewin G, Baba HA, Boknik P, Fabritz L, Kirchhefer U, Kirchhof P, Loser K, Matus M, Neumann J, Riemann B, Schmitz W** (2005) Heart-directed expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J Biol Chem* 280: 6906-6914
- Müller-Werdan U, Buerke M, Ebel H, Heinroth KM, Herklotz A, Loppnow H, Ruß M, Schlegel F, Schlitt A, Schmidt HB, Söffker G, Werdan K** (2006) Septic cardiomyopathy – a not yet discovered cardiomyopathy?. *Exp Clin Cardiol* 11: 226-236.
- Murthy KS, Zhou H, Makhoul GM** (2002) PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/VI in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C508-C517
- Nagayama T, Takimoto E, Sadayappan S, Mudd JO, Seidman JG, Robbins J, Kass DA** (2007) Control of in vivo left ventricular [correction] contraction/relaxation kinetics by

- myosin binding protein C: protein kinase A phosphorylation dependent and independent regulation. *Circulation* 116: 2399-2408
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N** (1997) Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-272
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM** (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457
- Neumann J, Maas R, Boknik P, Jones LR, Zimmermann N, Scholz H** (1999) Pharmacological characterization of protein phosphatase activities in preparations from failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 188-193
- Nomura M, Kato K, Nagasaka A, Shiga Y, Miyagi Y, Fukui R, Nakano H, Abo Y, Okajima S, Nakai A, Ohyama T, Hishida H, Watanabe Y, Mizuno Y** (1987) Serum beta-enolase in acute myocardial infarction. *Br Heart J* 58: 29-33
- Ohnishi M, Chida N, Kobayashi T, Wang H, Ikeda S, Hanada M, Yanagawa Y, Katsura K, Hiraga A, Tamura S** (1999) Alternative promoters direct tissue-specific expression of the mouse protein phosphatase 2C $\beta$  gene. *Eur J Biochem* 263: 736-745
- Palmer D, Jimmo SL, Raymond DR, Wilson LS, Carter RL, Maurice DH** (2007) Protein kinase A phosphorylation of human phosphodiesterase 3B promotes 14-3-3 protein binding and inhibits phosphatase-catalyzed inactivation. *J Biol Chem* 282: 9411-9419
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E** (2004) PI3K $\gamma$  modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118: 375-387
- Pavoine C, Behforouz N, Gauthier C, Le Gouvello S, Roudot-Thoraval F, Rücker-Martin C, Pawlak A, Feral C, Defer N, Houel R, Magne S, Amadou A, Loisanche D, Duvaldestin P, Pecker F** (2003)  $\beta_2$ -adrenergic signaling in human heart: shift from the cyclic AMP to the arachidonic acid pathway. *Mol Pharmacol* 64: 1117-1125
- Pavoine C, Defer N** (2005) The cardiac  $\beta_2$ -adrenergic signalling a new role for the cPLA $_2$ . *Cell Signal* 17: 141-152
- Pavoine C, Magne S, Sauvadet A, Pecker F** (1999) Evidence for a  $\beta_2$ -adrenergic/arachidonic acid pathway in ventricular cardiomyocytes – regulation by the  $\beta_1$ -adrenergic/cAMP pathway. *J Biol Chem* 274: 628-637
- Periyasamy S, Warriar M, Tillekeratne MPM, Shou W, Sanchez ER** (2007) The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* 148: 4716-4726
- Petit-Jacques J, Hartzell HC** (1996) Effect of arachidonic acid on the L-type calcium current in frog cardiac myocytes. *J Physiol* 493: 67-81
- Phrommintikul A, Chattipakorn N** (2006) Roles of cardiac ryanodin receptor in heart failure and sudden cardiac death. *Int J Cardiol* 112: 142-152

- Plenz G, Song ZF, Tjan TDT, Koenig C, Baba HA, Erren M, Flesch M, Wichter T, Scheld HH, Deng MC** (2001) Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure. *Eur J Heart Failure* 3: 415-421
- Pönicke K, Giessler C, Grapow M, Heinroth-Hoffmann I, Becker K, Osten B, Brodde OE** (2000) FP-receptor mediated trophic effects of prostanoids in rat ventricular cardiomyocytes. *British J Pharmacol* 129: 1723-1731
- Pönicke K, Gröner F, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE** (2006) Agonist-specific activation of the  $\beta_2$ -adrenoceptor/ $G_s$ -protein and  $\beta_2$ -adrenoceptor/ $G_i$ -protein pathway in adult rat ventricular cardiomyocytes. *British J Pharmacol* 147: 714-719
- Porzio MA, Pearson AM** (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490: 27-34
- Prajapati S, Verma U, Yamamoto Y, Kwak YT, Gaynor RB** (2004) Protein phosphatase 2C $\beta$  association with the I $\kappa$ B kinase complex is involved in regulating NF- $\kappa$ B activity. *J Biol Chem* 279: 1739-1746
- Promega Subcloning Notebook** (2004) Promega Corporation, Madison, WI, USA
- Ramsey AJ, Chinkers M** (2002) Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry* 41: 5625-5632
- Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP** (2007) Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock* 27: 10-18
- Sadayappan S, Gulick J, Osinska H, Martin LA, Hahn HS, Dorn GW, Klevitsky R, Seidman CE, Seidman JG, Robbins J** (2005) Cardiac myosin-binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ Res* 97: 1156-1163
- Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I** (2000) beta-adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 275: 34528-34533
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1998) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor
- Sasaki M, Ohnishi M, Tashiro F, Niwa H, Suzuki A, Miyazaki J, Kobayashi T, Tamura S** (2007) Disruption of the mouse protein ser/thr phosphatase 2C $\beta$  gene leads to early pre-implantation lethality. *Mechanisms of Development* 124: 489-499
- Schott P, Asif AR, Gräf C, Toischer K, Hasenfuss G, Kögler H** (2008) Myocardial adaptation of energy metabolism to elevated preload depends on calcineurin activity - a proteomic approach. *Basic Res Cardiol* 103: 232-243
- Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MHJ, Rietschel ET, Seydel U** (2000) Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 267: 2008-2013
- Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Zähringer U, Rietschel ET, Carroll SF, Koch MHJ, Kusumoto S, Seydel U** (1998) The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J Immunol* 161: 5464-5471
- Schwarz S, Hufnagel B, Dworak M, Klumpp S, Krieglstein J** (2006) Protein phosphatase type 2C $\alpha$  and 2C $\beta$  are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* 11: 1111-1119

- Shirato H, Shima H, Nakagama H, Fukuda H, Watanabe Y, Ogawa K, Matsuda Y, Kikuchi K** (2000) Expression in hepatomas and chromosomal localization of rat protein phosphatase 5 gene. *Int J Oncol* 17: 909-912
- Silbernagl S, Despopoulos A** (2003) Taschenatlas der Physiologie, 6. korrigierte Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart, Deutschland
- Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB** (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor-hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272: 16224-16230
- Simmerman HKB, Jones LR** (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947
- Sinclair C, Borchers C, Parker C, Tomer K, Charbonneau H, Rossie S** (1999) The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of ser/thr protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 274: 23666-23672
- Sing A, Merlin T, Knopf HP, Nielsen PJ, Loppnow H, Galanos C, Freudenberg MA** (2000) Bacterial induction of beta interferon in mice is a function of the lipopolysaccharide component. *Infection and Immunity* 68: 1600-1607
- Skinner J, Sinclair C, Romeo C, Armstrong D, Charbonneau H, Rossie S** (1997) Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 272: 22464-22471
- Smith WH, Nair RU, Adamson D, Kearney MT, Ball SG, Balmforth AJ** (2005) Somatostatin receptor subtype expression in the human heart: differential expression by myocytes and fibroblasts. *J Endocrinol* 187: 379-386
- Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J** (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266: 24613-24620
- Suk JY, Kim YS, Park WJ** (1999) HRC (histidine-rich  $Ca^{2+}$  binding protein) resides in the lumen of sarcoplasmic reticulum as a multimer. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 667-671
- Swingle MR, Honkanen RE, Ciszak EM** (2004) Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5. *J Biol Chem* 279: 33992-33999
- Tamura S, Guang M, Komaki K, Sasaki M, Kobayashi T** (2004) Roles of mammalian protein phosphatase 2C family members in the regulation of cellular functions. In: Arino J, Alexander DR (Hrsg.) *Protein phosphatases. Topics in Current Genetics* 5. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Seiten 91-105
- Tang X, Edwards EM, Holmes BB, Falck JR, Campbell WB** (2006) Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H37-H45
- Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V** (2001) Phosphorylation-dependent alteration in myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 362-367

- Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, Sugiyama S, Kuroda T, Hori M, Kawase I, Hirota H** (2005) AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 25: 9554-9575
- Tomsig JL, Snyder SL, Creutz CE** (2003) Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins. *J Biol Chem* 278: 10048-10054
- Turchin A, Guo CZ, Adler GK, Ricchiuti V, Kohane IS, Williams GH** (2006) Effect of acute aldosterone administration on gene expression profile in the heart. *Endocrinol* 147: 3183-3189
- Uematsu K, Futter M, Hsieh-Wilson LC, Higashi H, Maeda H, Nairn AC, Greengard P, Nishi A** (2005) Regulation of spinophilin ser94 phosphorylation in neostriatal neurons involves both DARPP-32-dependent and independent pathways. *J Neurochem* 95: 1642-1652
- Urban G, Golden T, Aragon IV, Cowser L, Cooper SR, Dean NM, Honkanen RE** (2003) Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression. *J Biol Chem* 278: 9747-9753
- Valks DM, Cook SA, Pham FH, Morrison PR, Clerk A, Sugden PH** (2002) Phenylephrine promotes phosphorylation of bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase A. *J Mol Cell Cardiol* 34: 749-763
- van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T** (2005) Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cardiovasc Res* 65: 28-39
- van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T** (2006) Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res* 71: 430-442
- Vaughan CK, Mollapour M, Smith JR, Truman A, Hu B, Good VM, Panaretou B, Neckers L, Clarke PA, Workman P, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH** (2008) Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperon-targeted dephosphorylation of cdc37. *Mol Cell* 31: 886-895
- Volke D, Hoffmann R** (2006a) Characterization of bovine tau-preparations by two-dimensional gel electrophoresis. *Protein Pept Lett* 13: 617-625
- Volke D, Hoffmann R** (2006b) Purification of bovine Tau versions by affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 50: 37-42
- von Kriegsheim A, Pitt A, Grindlay GJ, Kolch W, Dhillon AS** (2006) Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5. *Nature Cell Biol* 8: 1011-1016
- Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, Buchner J** (2006) The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone hsp90. *EMBO J* 25: 367-376
- Wang Z, Chen W, Kono E, Dang T, Garabedian MJ** (2007) Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* 21: 625-634
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR** (2006) Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *PNAS* 103: 511-518
- Wei Z, Thomas D, Karle CA, Kathöfer S, Schenkel J, Kreve VA, Ficker E, Wible BA, Kiehn J** (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of H-ERG potassium channels in a human cell line. *Chin Med J (Engl)* 115: 668-676

- Werner F, Gründker N, Boknik P, Gergs U, Rothemund S, Schmitz W, Neumann J** (2007) Protein phosphatase 5 substrates in the mammalian heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375 (Suppl 1): 62
- Westphal E** (2003) Unterschiedliche Expressierung von Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ) und IL-1 Rezeptor Antagonist im kardiovaskulären System: Untersuchungen an Patientengewebe und isolierten Zellen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB** (2002) Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- $\kappa$ B activation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H872-H879
- Wu LL, Liu MS** (1992) Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. *J Surgical Res* 53: 82-90
- Wu LL, Tang C, Dong LW, Liu MS** (2002) Altered phospholamban -calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. *Shock* 17: 389-393
- Wu-Wong JR, Dayton BD, Oppenorth TJ** (1996) Endothelin-1-evoked arachidonic acid release: a Ca<sup>(2+)</sup>-dependent pathway. *Am J Physiol* 271: C869-C877
- Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SRW** (2006) Ser-2030, but not ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon  $\beta$ -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396: 7-16
- Xu X, Lagercrantz J, Zickert P, Bajalica-Lagercrantz S, Zetterberg A** (1996) Chromosomal localization and 5' sequence of the human protein serine/threonine phosphatase 5' gene. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 514-517
- Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K, Negishi M** (2002) G $\alpha$ <sub>12</sub> and G $\alpha$ <sub>13</sub> interact with ser/thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* 12: 1353-1358
- Yang J, Roe SM, Cliff MJ, Williams MA, Ladbury JE, Cohen PTW, Barford D** (2005) Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J* 24: 1-10
- Yong W, Bao S, Chen H, Li D, Sánchez ER, Shou W** (2007) Mice lacking protein phosphatase 5 are defective in ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem* 282: 14690-14694
- Zeke T, Morrice N, Vázquez-Martin C, Cohen PTW** (2005) Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocadazole. *Biochem J* 385: 45-56
- Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR** (1997) Complex formation between junction, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272: 23389-23397
- Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD** (1995) Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ Res* 76: 1028-1035

- Zhao W, Wu J, Zhong L, Srivastava A** (2006) Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer: role of a cellular serine/threonine protein phosphatase in augmenting transduction efficiency. *Gene Therapy* 14: 1-6
- Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE** (2004) ser/thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 279: 46595-46605
- Zhu G, Qu Z, Cui N, Jiang C** (1999) Suppression of Kir2.3 activity by protein kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53. *J Biol Chem* 274: 11643-11646

## 8. Anhang

### 8.1. Puffer und Lösungen

Agar-Platten mit Ampicillin:	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar autoklaviert abgekühlt auf 50 °C 100 bzw. 50 µg/ml Ampicillin Platten unter Sterilbank gegossen
Ampicillin-Stamm (100 mg/ml):	100 mg Ampicillin 1 ml steriles destilliertes Wasser sterilfiltriert
Ansatz für die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase:	0,009 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,25 mM Luminol 0,225 mM p-Cumarsäure 100 mM Tris/HCl pH 8,5
Applikationslösung:	27,5 mM L(+)-Ascorbinsäure 219 µM Na-Metabisulfit in Lösung C
AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 1,49 % (w/v) Triethanolamin pH 9,4
10 % APS:	1 g APS/10 ml destilliertes Wasser
Arachidonsäure (10 mg/ml):	10 mg Arachidonsäure gelöst in 1 ml 100 % reinen, unvergällten Alkohol in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei -80 °C gelagert
BCIP:	50 mg BCIP in 1 ml DMF
Benzamidin-Stamm (100 mM):	100 mM Benzamidin
Coomassie-Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung:	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 2,5 g/l Brilliant-Blue G
Denaturierungspuffer:	63,3 % (v/v) Formamid 9 % (v/v) Formaldehyd in 1 x MOPS bei -20 ° maximal eine Woche gelagert

---

DEPC-Wasser:	0,2 % (w/v) DEPC über Nacht durch Rühren gemischt autoklaviert
Dialysepuffer:	50 mM Tris pH 7,5
Dialysierlösung:	50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 0,1 % (v/v) Triton X-100
EB-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,5
EDTA-Na-Pyrophosphat-Puffer:	100 mM EDTA 100 mM Na-Pyrophosphat pH 7,0
Elektrophoresepuffer:	51,6 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Elutionspuffer für PP2C:	20 mM Tris-HCl 5 mM Imidazol 500 mM NaCl pH 7,9
Elutionspuffer für PP5:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0
G-50-Puffer:	50 mM Tris-HCl 0,1 mM-EGTA 5 % (v/v) Glycerin 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> pH 7,0
Homogenisationspuffer Zytosol:	50 mM Tris-HCl pH 7,4 10 µl/ml PMSF-Stammlösung 10 µl/ml Benzamidin-Stammlösung
IPTG-Stamm (1 M):	1 M IPTG (0,24 g/ml) sterilfiltriert bei -20 °C gelagert
Krebs-Henseleit-Puffer:	118 mM NaCl 25 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,5 mM EDTA 4,7 mM KCl 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 11 mM Glukose pH 7,4, mit Carbogen begast

---

Ladepuffer (für RNA):	gesättigte Bromphenolblaulösung 50 % (v/v) Glycerin in DEPC-Wasser
1 x Ladepuffer für SDS-Page mit DTT:	3 mg DTT/ml 1 x Ladepuffer für SDS-Page
3 x Ladepuffer für SDS-Page mit SDS:	30 mM Tris-Base 3 mM EDTA 15 % (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS pH 7,8 Spur Bromphenolblau
2 x Ladepuffer für SDS-Page ohne SDS:	20 mM Tris-Base 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin pH 7,8 Spur Bromphenolblau
LB-Medium mit 20 mM MgSO <sub>4</sub> :	LB-Medium 20 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O autoklaviert
LB-Medium:	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt autoklaviert
LEW-Puffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl pH 8,0
Lösung A:	Joklik-MEM 24 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,6 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM L-Carnitin 10 mM Creatin 20 mM Taurin mit Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) begast pH 7,2 bei 37 °C eingestellt
Lösung B:	Lösung A 1 mM CaCl <sub>2</sub> 60 - 180 U/ml Trypsin mit Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) begast pH 7,2 bei 37 °C eingestellt
Lösung C:	132 mM NaCl 4,4 mM KCl 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 10 mM Glucose 10 mM HEPES

---

Lösung C1:	2,5 mM Na-Pyruvat pH 7,4 Lösung A 0,1 % (w/v) fettsäurefreies BSA 60 - 180 U/ml Trypsin 90 U/ml Collagenase mit Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) begast pH 7,2 bei 37 °C eingestellt
Lösung D:	Lösung A 1 % fettsäurefreies BSA 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> mit Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) begast pH 7,2 bei 37 °C eingestellt
Lysispuffer P2 (LY):	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Lysozym-Stamm: 10 x MOPS:	100 mg Lysozym/ml steriles destilliertes Wasser 200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat wasserfrei 10 mM EDTA ad 2 l destilliertes Wasser autoklaviert
Na-Acetat: NBT:	3 M Na-Acetat pH 6 50 mg NBT 300 µl destilliertes Wasser 700 µl DMF
Neutralisationspuffer P3 (NE): Phosphorylierungsmix:	3 M Kaliumacetat pH 5,5 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,2 µM ATP (kalt) 250 U PKA 0,5 mCi [ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-ATP in PP-Basispuffer mit Mg-Acetat
PMSF-Stamm:	50 mM PMSF in 100 % Ethanol
pNPP-Puffer:	50 mM Tris 33 mM MgCl <sub>2</sub> 6 mM CaCl <sub>2</sub> pH 8,0 frisch dazugeben: 1 mM DTT
Ponceau-Rot-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) TCA
2 x Porziogelpuffer:	0,4 % (w/v) Polyacrylamid 0,2 M Tris-Base 0,6 M Glycin

	0,12 mM EDTA
	0,2 % (w/v) SDS
	10 % (v/v) Glycerin
	pH 8,8
Porzio-Trenngel (10 %):	37,5 ml Porziopuffer 2 x
	24,5 ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30
	6,25 ml Glycerin
	6,385 ml destilliertes Wasser
	65 µl TEMED
	300 µl 10 % (w/v) APS
Porzio-Trenngel (12 %):	37,5 ml Porziopuffer 2 x
	29,5 ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30
	6,25 ml Glycerin
	1,385 ml destilliertes Wasser
	65 µl TEMED
	300 µl 10 % (w/v) APS
PP-Basispuffer mit Magnesiumacetat:	10 mM Magnesiumacetat -Tetrahydrat in PP-Basispuffer
PP-Basispuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	0,1 mM EGTA
Prähybridierungs-Lösung:	0,5 % (w/v) SDS
	100 µg/ml Salmon Sperm DNA (denaturiert)
	50 % (v/v) deionisiertes Formamid
	in 5 x Denhardt-Lösung
	in 6 x SSC
Proteinstandard:	von Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinstandard:	0,6 mg/ml Lipoxidase
	0,1 mg/ml BSA
	0,175 mg/ml Albumin aus Hühnereiweiß
	0,4 mg/ml Carboanhydrase
	0,5 mg/ml Chymotrypsinogen A
	0,25 mg/ml Ribonuclease A
	0,25 mg/ml Cytochrom C
	in 1 x Ladepuffer für SDS-Page mit SDS und 3 mg/ml DTT
	Aliquots von 100 µl bei -20 °C gelagert vor Auftragen 10 Minuten bei 95 °C hitzedenaturiert
Puffer I:	20 mM Tris-HCl pH 7,4
	5 mM EDTA
	2 mM EGTA
Puffer II:	frisch hergestellt
	9,8 ml Puffer I

---

Resuspensionspuffer P1 (RE):	100 µl PMSF-Stammlösung 100 µl Benzamidin-Stammlösung 50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Sammelgel (4 %, Lämmli):	100 µg/ml RNase A 4,7 ml Sammelgelpuffer 2,55 ml Rotiphorese® Gel 30 11,8 ml destilliertes Wasser 12 µl TEMED
Sammelgel (4,6 %, Lämmli):	190 µl 10 % (w/v) APS 1,6 ml Rotiphorese® Gel 30 7,2 ml destilliertes Wasser 1 ml 1,25 M Tris pH 6,8 100 µl 10 % (w/v) SDS 20 µl TEMED
Sammelgelpuffer:	68 µl 10 % (w/v) APS 0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
1 x SSC:	0,15 M NaCl 0,015 M Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0
Stammlösung A:	2 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0,1 N NaOH
STE-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 0,25 mM EDTA pH 8,0
Strippingpuffer:	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7 2 % (w/v) SDS 100 mM 2-Mercaptoethanol
Substratpuffer für PP2C:	50 mM Tris-HCl 0,1 mM EGTA 1 mg/ml BSA pH 7,0 sterilfiltriert
50 x TAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat 5 M Natriumacetat 0,5 M EDTA pH 7,8
TBS:	10 mM Tris-Base 154 mM NaCl

---

TBST:	pH 7,4 TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
TCA-Lösung:	pH 7,4 50 % (w/v) TCA
TE 0,5 % SDS:	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 0,5 % (w/v) SDS in DEPC-Wasser
TE/SDS-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8 100 mM EDTA 0,5 % (w/v) SDS
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,25 mM EDTA
TFB1-Puffer:	30 mM Natriumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 100 mM RbCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 steril filtriert
TFB2-Puffer:	100 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glycerin pH 6,5 steril filtriert
Transferpuffer:	210 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 40 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
Trenngel (15 %, Lämmli):	11,25 ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 6 ml destilliertes Wasser 4,5 ml 1,8 M Tris pH 8,8 225 µl 10 % (w/v) SDS 22,5 µl TEMED 150 µl 10 % (w/v) APS
Waschpuffer:	50 mM Tris 400 mM NaCl pH 7,5
YT-Medium:	1,6 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl

**8.2. verwendete Restriktionsenzyme**

Restriktionsenzym	Puffer	Units/10 µg DNA	Hersteller
BamHI	Puffer BamHI	8	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Eco52I	Puffer Eco52I	20	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
EcoRI	Puffer EcoRI	10	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
KpnI	Puffer KpnI	100	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
NruI	Puffer NruI	25	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

**8.3. PCR****PCR-Ansatz**

Substanz:	
DNA	etwa 4 µg
Forward-Primer	1 µM
Reverse-Primer	1 µM
Triple Master Polymerase Mix (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland)	3,5 U
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	200 µM
in High Fidelity PCR-Puffer	ad 50 µl

**verwendete PCR-Primer**

Konstrukt:	Primer:	Sequenz:	Annealing-temperaturen (°C):	Schnittstelle für:
pcDNA-PP5	pcDNA-PP5-Forward-Primer:	5'-tca cg <sup>v</sup> g atc cga agg cga acg tac t-3'	57,9; 60,9; 64,2; 67,0	BamHI
pcDNA-PP5	pcDNA-PP5-Reverse-Primer:	5'-cga cg <sup>v</sup> a att cac atc att cct agc t-3'	57,9; 60,9; 64,2; 67,0	EcoRI
α-MHC-PP2C <sub>β</sub>	PP2Cb-Kpn	5'-ggt ac <sup>c</sup> cta cca tgg gtc ttc tag-3'	51,6; 56,8; 60,0	KpnI
α-MHC-PP2C <sub>β</sub>	PP2Cb-Eco	5'-c <sup>v</sup> gg ccg atg ggt gca ttt ttg g-3'	51,6; 56,8; 60,0	Eco52I

**PCR-Programm**

Zyklen:	Zeit (Minuten):	Temperatur (°C):	Bemerkungen:
1 x	2:00	95	Optimierung der PCR-Bedingungen
30 x	0:30	95	
	0:30	Annealingtemperatur(en)	
	1:30	72	
1 x	5:00	72	
1 x	hold	4	

**8.4. PCR zur Genotypisierung der PP5-transgenen Mauslinie****PCR-Ansatz zur Genotypisierung der PP5-K20-Mauslinie**

Substanz:	
DNA	etwa 0,1 – 0,5 µg
Forward-Primer	1 µM
Reverse-Primer	1 µM
Ampliqon Taq DNA-Polymerase	1,25 U
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	200 µM
in Standardpuffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid	ad 20 µl

**PCR-Primer zur Genotypisierung der PP5-K20-Mauslinie**

Konstrukt (Transgen):	Primer:	Sequenz:	Annealingtemperatur (°C):
αMHC-PP5-K20	MHC-SEQ-P1	5'-acc ctt acc cca cat aga cc-3'	55
αMHC-PP5-K20	rPP5-SEQ-P3R	5'-gct tca cct tca cca ccg tc-3'	55

**PCR-Programm zur Genotypisierung der PP5-K20-Mauslinie**

Zyklen:	Zeit (Minuten):	Temperatur (°C):	Bemerkungen:
1 x	2:00	94	5 Sekunden Inkrement
10 x	0:30	94	
	0:30	55	
	2:00	72	
20 x	0:30	94	
	0:30	55	
	2:00 + 5''	72	
1 x	5:00	72	
1 x	hold	4	

### 8.5. Primer für Sequenzierungen

Primer:	Konstrukt:	Sequenz:	Position im Plasmid:
MHC-SEQ-P1	$\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$	5'-acc ctt acc cca cat aga cc-3'	8342 forward
M13 forward	$\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$	5'-tgt aaa acg acg gcc cca gt-3'	9936 reverse
PP2Cb-SEQ-P1	$\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$	5'-aac aac gaa gac ttc agg gc-3'	8796 forward
PP2Cb-Kpn	$\alpha$ -MHC-PP2C $\beta$	5'-ggg ac <sup>v</sup> c cta cca tgg gtc ttc tag-3'	9683 reverse

### 8.6. Ligations-Ansatz

	Kontrolle	Fragment/Vektor
$\mu$ l Vektor	1	1
$\mu$ l Fragment	0	9
U T4-Ligase	2	2
Ligationspuffer T4	ad 20 $\mu$ l	ad 20 $\mu$ l

### 8.7. Größenbereiche für Proteinnachweise im Westernblot

**Größenbereich (kDa):**    **nachzuweisendes Protein:**

67 - 110	SERCA
45 - 67	PP5
45 - 65	Calsequestrin
30 - 67	PP2C $\beta$
14 - 30	Phospholamban

### 8.8. Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper:	Medium 1. Antikörper:	Verdünnung 1. Antikörper:	2. Antikörper:
anti-Calsequestrin	5 % (w/v) Milhpulver in TBST	1:10.000	anti-rabbit IgG
anti-Junctin (JCN4)	5 % (w/v) Milhpulver in TBST	1:1.000	anti-rabbit IgG
anti-Phospholamban	2 % (w/v) BSA in TBST	1:5.000	anti-mouse IgG
anti-PP2C $\beta$	5 % (w/v) BSA in TBS	1:1.000	anti-rabbit IgG- HRP, nachgewiesen mit ECL
anti-PP5 (für Nachweis rekombinanter PP5 und zur Unterscheidung von Wildtypen und transgenen Mäusen)	5 % (w/v) Milhpulver in TBST	1:1.000	anti-mouse IgG

anti-PP5 (für Nachweis von PP5 in Herzgeweben von Ratte, Mensch und Maus (Wildtyp))	5 % (w/v) Milchpulver in TBST	1:500	anti-mouse IgG
anti-Ser16P-Phospholamban	2 % (w/v) BSA in TBST	1:5000	anti-rabbit IgG
anti-SERCA	5 % (w/v) Milchpulver in TBST	1:3000	anti-mouse IgG
anti-Thr17P-Phospholamban	2 % (w/v) BSA in TBST	1:5000	anti-rabbit IgG
anti-Triadin (TRN6)	5 % (w/v) Milchpulver in TBST	1:1.000	anti-rabbit IgG
Phospho-Threonin-Antikörper (P-Thr-Polyclonal)	5 % (w/v) BSA in TBST Protokoll von Cell Signaling Technology®	1:1.000	anti-rabbit IgG
Tetra-His-Antikörper	3 % (w/v) BSA in TBS Protokoll von Qiagen GmbH	1:1000	anti-mouse IgG

### 8.9. Ansätze zum Versuch Phosphorylierung der PP5 durch PKA

Ansätze	1	2	3
PP5 Eluat 1 (µg)	30	30	-
PKA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, U)	-	125	125
[ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-ATP (mCi)	0,15	0,15	0,15
ATP (kalt) (µM)	1	1	1
PP-Basispuffer mit Magnesiumacetat	ad 200 µl aufgefüllt	ad 200 µl aufgefüllt	ad 200 µl aufgefüllt

### 8.10. Bezugsquellen

#### 8.10.1. Substanzen

##### Firma:

AppliChem GmbH, Darmstadt,  
Deutschland  
Biochrom AG, Berlin, Deutschland  
Boehringer Mannheim GmbH,  
Mannheim, Deutschland  
Calbiochem/EMD Biosciences, La Jolla,  
CA., USA  
Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe,

##### Substanzen:

NaCl, Tris  
Collagenase  
PMSF  
Lipopolysaccharid, *E. coli* O55:B5, rekombinantes  
DARPP-32 (Ratte)  
Ampicillin, APS, EDTA, Ethanol, Formaldehyd,

Deutschland	Formamid, Glycerin, Glycin, Hefeextrakt, IPTG, Isopropanol, Lysozym, 2-Mercaptoethanol, Methanol, MOPS, NaN <sub>3</sub> , NaOH, Polyacrylamid, Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30, Triethanolamin, Tris-HCl
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Sheared Salmon Sperm DNA (10 mg/ml)
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, BCIP-T, DTT, NBT, RNase A (für Minipräparationen)
Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland	[ <sup>32</sup> P]-Phosphorsäure (37 MBq/mCi), [ <sup>α-32</sup> P]dCTP (3.000 Ci/mmol), [ <sup>γ-32</sup> P]-ATP (110 TBq/mmol), [ <sup>γ-33</sup> P]-ATP
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Medium M199, Neugeborenes Kälberserum, Penicillin/Streptomycin, TRIzol
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Benzonase (Reinheitsgrad II, 10.000 U/Glas), BSA, CaCl <sub>2</sub> , Chloroform, Essigsäure, Essigsäure-Anhydrid, Glucose, HClO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , L(+)-Ascorbinsäure, MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Natriumcitrat-Dihydrat, N-Hydroxybenzotriazol, Piperidin, SDS, Trifluoressigsäure, Tris-Base, Tween 20
New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M, Deutschland	PKA
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	Adenosindeaminase (from calf intestine, 10 mg/ml), Proteaseinhibitoren (complete, EDTA free)
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Carboanhydrase B aus Rindererythrozyten, Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas, Cytochrom C aus Pferdeherz lyophil., Lipoxidase aus Sojabohnen, Ribonuclease A aus Rinderpankreas (für Proteinstandard), TEMED
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Agar, Albumin aus Hühnereiweiß, Arachidonsäure, ATP, Benzamidin, Brilliant-Blue G, Bromphenolblau, Creatin, Denhardt-Lösung, Dichlormethan, Diisopropylcarbodiimid, DL-Homocystein, DMF, EGTA, Ethidiumbromid (1%ige Lösung), fettsäurefreies BSA, Glutathion, HEPES, Imidazol, Joklik-MEM, Kaliumacetat, KCl, L-Carnitin, Magnesium-Acetat-Tetrahydrat, MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, Na-Metabisulfit, Na-Pyrophosphat, Na-Pyruvat, Natriumacetat, Natriumacetat wasserfrei, Pepton, PKA (wegen Lieferschwierigkeiten Firma gewechselt), Ponceau S, Proteinase K, RbCl <sub>2</sub> , Sephadex G-50 Superfine, Taurin, TCA, Triton X-100, Trypsin, Trypton,

TSI GmbH und Co. KG, Zeven, Deutschland	Urethan, Magermilchpulver
<b>8.10.2. Antikörper</b>	
<b>Firma/Herkunft:</b> Badrilla Ltd., Leeds, Großbritannien	<b>Antikörper:</b> anti-Phospholamban, anti-Ser16P-Phospholamban, anti-Thr17P-Phospholamban
BD Biosciences – Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	anti-PP5
Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	rabbit anti-Phospho-Threonin (P-Thr-Polyclonal)
Prof. L. Jones, University of Indianapolis, IN, USA	anti-Calsequestrin, anti-Junctin (JCN4), anti- SERCA, anti-Triadin (TRN6)
Prof. S. Klumpp, Universität Münster, Deutschland	anti-PP2C <sub>β</sub>
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Tetra-His-Antikörper
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	mouse anti-rabbit IgG-HRP
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	anti-mouse polyvalent Immunoglobulins (GAM) – Alkaline Phosphatase Antibody produced in goat, anti-rabbit IgG (whole molecule) - Alkaline Phosphatase Antibody produced in goat

### 8.11. Peptide für Peptidmembran

Substrat:	Phosphorylierungsstelle:	Sequenz:	Datenbanknummer:	Referenz:
AKAP95	Ser325	RADSDGDLSENDDGAGDL	Q9DBR0 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: Protein Q9DBR0
ANP	Ser104	ASRRSPWDPSDRSALLKSK	P05125 (Pubmed)	Shabb, 2001
B2AR	Ser262	RSGHGLRRSSKFCLKEHKA	P18762 (Pubmed)	Shabb, 2001
B2AR	Ser346	QELLCLRRSSKTYGNGYS	P18762 (Pubmed)	Shabb, 2001
B2AR	Ser261	GRSGHGLRRSSKFCLKEHK	P18762 (Pubmed)	Shabb, 2001
B2AR	Ser345	FQELLCLRRSSSKTYGNGY	P18762 (Pubmed)	Shabb, 2001
BAD	Ser155	RYGRELRMSDEFEGSFKG	AAA64465 (Pubmed)	Shabb, 2001
CICC	Ser1392	NFDYLTRDWSILGPHHLDE	Q02789 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: Protein Q02789
CICC	Ser1502	IIKKIWKRTSMKLLDQVIP	Q02789 (Pubmed)	Leach et al., 1996, Pubmed-Datenbank: Protein Q02789
CICC	Ser687	EERKRRKMSKGLPDKSEE	Q02789 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: Protein Q02789
CICC	Ser1575	AAPEIHRAISGDPTAEEEL	Q02789 (Pubmed)	Leach et al., 1996, Pubmed-Datenbank: Protein Q02789
Connexin 43	Ser373	SSRASSRASSRPRPDLEI	CAA43778 (Pubmed)	Lampe und Lau, 2004
Connexin 43	Ser364	PLAIVDQRPSRASSRASS	CAA43778 (Pubmed)	Lampe und Lau, 2004
Connexin 43	Ser365	LAIVDQRPSRASSRASSR	CAA43778 (Pubmed)	Lampe und Lau, 2004
Connexin 43	Ser369	DQRPSRASSRASSRPRPD	CAA43778 (Pubmed)	Lampe und Lau, 2004
CREB	Ser133	RREILSRRPSYRKILNDLS	Q01147 (Pubmed)	Shabb, 2001
CREMt	Ser113	DSHKRREILSRRPSYRKIL	P27699 (Pubmed)	Shabb, 2001
CREP	Ser44	LKFGPARNDSVIVADQTPT	P16951 (Pubmed)	Sakurai et al., 1991

DARPP-32	Thr34	VEMIRRRRPTPATLVLTSD	Q60829 (Pubmed)	Hemmings et al., 1984, Williams et al., 1986
EF-2-Kinase	Ser499	PSRLHLPRPSAVALEVQRL	O08796 (Pubmed)	Shabb, 2001
Fos	Ser362	SCAAHRKGSSSNEPSSDS	CAA24105 (Pubmed)	Tratner et al., 1992
G <sub>α13</sub>	Thr203	QDILLARRPTKGIHEYDFE	NP_034433 (Pubmed)	Manganello et al., 2003
Glykogen PP1	Ser67	TPTSASRRVSFADSLGFSL	Q99MR9 (Pubmed)	Shabb, 2001
Glykogen PP1	Ser44	FKPGFSPQPSRRGSGSSED	Q99MR9 (Pubmed)	Shabb, 2001
hERG	Ser1140	PQDGPTRRLSLPGQLGALT	O35219 (Pubmed)	Thomas et al., 1999
hERG	Ser285	ESCASVRRASSADDIEAMR	O35219 (Pubmed)	Thomas et al., 1999
Inhibitor-1	Thr35	AEQIRRRRPTPATLVLTSD	Q9ERT9 (Pubmed)	Shabb, 2001
IP3R	Ser1588	SARNAARRDSVLAASRDYR	NP_034715 (Pubmed)	Shabb, 2001
IP3R	Ser1755	NIRPSGRRESLTSFGNGPL	NP_034715 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kir2.1	Ser426	LHNQASVPLEPRPLRRESEI	P35561 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kir2.3	Ser443	RMQAATLPLDNISYRRESRI	P52189 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kir6.2	Ser372	SSRGPLRKRSVAVAKAKPK	Q61743 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kir6.2	Thr224	IHMQVVRKTTSPERGEVVPL	Q61743 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kv1.1 <sub>α</sub>	Ser446	SDSDLRRRSSTISKSEYM	P16388 (Pubmed)	Shabb, 2001
Kv4.2 <sub>α</sub>	Ser552	ANVSGSHRGSVQELSTIQI	NP_062671 (Pubmed)	Shabb, 2001, van der Heyden et al., 2006
Kv4.2 <sub>α</sub>	Thr38	APPRQERKRTQDALIVLNV	NP_062671 (Pubmed)	Shabb, 2001, van der Heyden et al., 2006
LTCC-a1	Ser1487	NFDYLTRDWSILGPHHLDE	Q01815 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: P15381 (Kaninchen), Vergleich mit Q01815 (Maus)
LTCC-a1	Ser1897	RSASLGRRASFHLECLKRQ	Q01815 (Pubmed)	Shabb, 2001, Yang et al., 2005

LTCC-a1	Ser1889	PSPKRSFLR <b>S</b> ASLGRRASF	Q01815 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: P15381 (Kaninchen), Vergleich mit Q01815 (Maus)
LTCC-a1	Ser1670	IGPEIRRAI <b>S</b> GDLTAEEL	Q01815 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: P15381 (Kaninchen), Vergleich mit Q01815 (Maus)
LTCC-a1	Ser1597	IIKKIWKRT <b>S</b> MKLLDQVVP	Q01815 (Pubmed)	Pubmed-Datenbank: P15381 (Kaninchen), Vergleich mit Q01815 (Maus)
LTCC-β2a	Ser530	VKKSQHRSS <b>S</b> ATHQNHRSGT	NP_075605 (Pubmed)	Shabb, 2001
LTCC-β2a	Ser529	PVKKSQHRSS <b>S</b> ATHQNHRSG	NP_075605 (Pubmed)	Shabb, 2001
LTCC-β2a	Ser510	PDRSAPRSA <b>S</b> QAEEPCLE	NP_075605 (Pubmed)	Shabb, 2001
MBC-C	Ser282	SLAGAGRRT <b>S</b> DSHEDAGTP	NP_032679 (Pubmed)	Shabb, 2001
MBC-C	Ser302	FSSLLKKRDS <b>S</b> FRRDSKLEA	NP_032679 (Pubmed)	Shabb, 2001
MBC-C	Ser273	DLRSAFRRT <b>S</b> LAGAGRRTS	NP_032679 (Pubmed)	Shabb, 2001
Na-K-H1 <sub>α</sub>	Ser943	LVICKTRRNS <b>S</b> VFQQGMKNK	Q8VDN2 (Maus)	Shabb, 2001
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz)	Ser525	SRTSMRPRSS <b>S</b> RGSIPTFRR	NP_067519 (Pubmed)	Shabb, 2001
Na-K-H1 <sub>α</sub> (Herz)	Ser528	SRTSMRPRSS <b>S</b> RGSIPTFRR	NP_067519 (Pubmed)	Shabb, 2001
NHE3	Ser540	YVAEGERRG <b>S</b> LAFIRSPST	XP_127434 (Pubmed)	Shabb, 2001
NHE3	Ser593	MQSLEQRRR <b>S</b> IRDTEDMVT	XP_127434 (Pubmed)	Shabb, 2001
PDE3B	Ser10	GIPEMFRRP <b>S</b> LPCISREQM	Q61409 (Pubmed)	Shabb, 2001
PDE4D3	Ser129	NFVHSQRRE <b>S</b> FLYRSDSDY	Q01063 (Pubmed)	Dodge et al., 2001, Murthy et al., 2002
PKA-RII <sub>α</sub>	Ser96	VPSKFTRRV <b>S</b> VCAETFNP	P12367 (Pubmed)	Shabb, 2001
PLB	Ser16	LTRSAIRRA <b>S</b> TIEMPQAR	NP_075618 (Pubmed)	Shabb, 2001
PLC-β3	Ser1105	KILDRKRNN <b>S</b> ISEAKTREK	P51432 (Pubmed)	Shabb, 2001

PLC- $\gamma$ 1	Ser1248	LFHVRAREG <b>S</b> FEARYQQPF	NP_067255 (Pubmed)	Shabb, 2001
PLM	Ser88	DEEEGTFR <b>S</b> SIRRL <b>S</b> RRR	Q9Z239 (Pubmed)	Despa et al., 2005, Shabb, 2001
PPP1R9B	Ser100	VRLSLPRAS <b>S</b> LNENVDHSA	CAI23964 (Pubmed)	Hsieh-Wilson et al., 2003
PPP1R9B	Ser94	RASDRGVRL <b>S</b> LPRASSLNE	CAI23964 (Pubmed)	Hsieh-Wilson et al., 2003
RyR2	Ser2030	DLTIRGRLL <b>S</b> LVEKVTYLK	NP_076357 (Pubmed)	Xiao et al., 2005 und 2006
RyR2	Ser2808	ALYNRTRRISQTSQV <b>S</b> IDA	NP_076357 (Pubmed)	Lehnart et al., 2004, Shabb, 2001
TnI	Ser151	RPTLRRVRISADAM <b>S</b> MQALL	P48787 (Pubmed)	Moir und Perry, 1977
TnI	Ser23	PAPAPVRRR <b>S</b> SANYRAYAT	P48787 (Pubmed)	Shabb, 2001
TnI	Ser24	APAPVRRR <b>S</b> SANYRAYATE	P48787 (Pubmed)	Shabb, 2001
VASP	Ser153	QPEHMERRV <b>S</b> NAGGPPAPP	P70460 (Pubmed)	Chen et al., 2004
VASP	Ser235	IAGAKLRKV <b>S</b> KQEEASGGP	P70460 (Pubmed)	Chen et al., 2004
VASP	Thr275	AMLARRRKAT <b>S</b> QVGEKPPKD	P70460 (Pubmed)	Chen et al., 2004
Vimentin	Ser47	YSLGSALRP <b>S</b> TSRSLYSSS	P20152 (Pubmed)	Ando et al., 1989
Vimentin	Ser51	SALRPSTSR <b>S</b> LYSSSPGGA	P20152 (Pubmed)	Ando et al., 1989
Vimentin	Ser7	MSTRSV <b>S</b> SSSYRRMFGGSGT	P20152 (Pubmed)	Ando et al., 1989
Vimentin	Ser25	GGSGTSSRP <b>S</b> SNRSYVTTS	P20152 (Pubmed)	Ando et al., 1989
Yotiao	Ser43	KQKKKRTSS <b>S</b> KHDSSLHTD	NP_919444 (Pubmed)	Chen et al., 2005

## 8.12. Literatur Phosphopeptide

- Ando S, Tanabe K, Gonda Y, Sato C, Inagaki M** (1989) Domain- and sequence-specific phosphorylation of vimentin induces disassembly of the filament structure. *Biochemistry* 28: 2974-2979
- Chen L, Daum G, Chitale K, Coats SA, Bowen-Pope DF, Eigenthaler M, Thumati NR, Walter U, Clowes AW** (2004) Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1403
- Chen L, Kurokawa J, Kass RS** (2005) Phosphorylation of the AKAP yotiao contributes to PKA regulation of a heart potassium channel. *J Biol Chem* 280: 31347-31352
- Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia L, Kutchai H, Tucker AL, Bers DM** (2005) Phospholemman-phosphorylation mediates the  $\beta$ -adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes. *Circ Res* 97: 252-259
- Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD** (2001) mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 20: 1921-1930
- Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P** (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein – II. comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1. *J Biol Chem* 259: 14491-14497
- Hsieh-Wilson LC, Benfenati F, Snyder GL, Allen PB, Nairn AC, Greengard P** (2003) Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *J Biol Chem* 278: 1186-1194
- Lampe PD, Lau AF** (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1171-1186
- Leach RN, Brickley K, Norman RI** (1996) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates residues in the C-terminal domain of the cardiac L-type calcium channel  $\alpha_1$  subunit. *Biochim Biophys Acta* 1281: 205-212
- Lehnart SE, Wehrens XHT, Marks AR** (2004) Calstabin deficiency, ryanodine receptors, and sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1267-1279
- Manganello JM, Huang JS, Kozasa T, Voyno-Yasenetskaya TA, Le Breton GC** (2003) Protein kinase A-mediated phosphorylation of the  $G\alpha_{13}$  switch I region alters the  $G\alpha\beta\gamma_{13}$ -G protein coupled-receptor complex and inhibits rho activation. *J Biol Chem* 278: 124-130
- Moir AJG, Perry J** (1977) The sites of phosphorylation of rabbit cardiac Troponin I by adenosin 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochem J* 167: 333-343
- Murthy KS, Zhou H, Makhlouf GM** (2002) PKA-dependent activation of PDE3A and PDE4 and inhibition of adenylyl cyclase V/VI in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C508-C517

- Sakurai A, Maekawa T, Sudo T, Ishii S, Kishimoto A** (1991) Phosphorylation of cAMP response element-binding protein, CRE-BP1, by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochim Biophys Res Commun* 181: 629-635
- Shabb JB** (2001) Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101: 2381-2411
- Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathöfer S, Schöls W, Kübler W, Kiehn J** (1999) Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the H-ERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem* 274: 27457-27462
- Tratner I, Ofir R, Verma IM** (1992) Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-fos protein augments its transforming potential. *Mol Cell Biol* 12: 998-1006
- van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T** (2006) Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res* 71: 430-442
- Williams KR, Hemmings HC, LoPresti MB, Konigsberg WH, Greengard P** (1986) DARPP-32, a dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein. *J Biol Chem* 261: 1890-1903
- Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SRW** (2005) Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* 96: 847-855
- Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, Shimoni Y, Cheng H, Ter Keurs H, Chen SRW** (2006) Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon  $\beta$ -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J* 396: 7-16
- Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF, Marx SO** (2005) Ser<sup>1928</sup> is a common site for Ca<sub>v</sub>1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 280: 207-214

## Danksagung

Prof. J. Neumann möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung und Bereitstellung der finanziellen Mittel, die diese Arbeit ermöglichten, danken. Herrn Prof. G. Fischer danke ich für die naturwissenschaftliche Betreuung und dem der Arbeit entgegengebrachten Interesse. Bei Dr. U. Gergs möchte ich mich für das Interesse am Fortgang der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und das engagierte Korrekturlesen der Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich Dr. U. Gergs für die Bereitstellung des Plasmids für die Expression der rekombinanten PP5 und der transgenen Tierlinien PP5-K20 und PP5-K14 danken. Dr. P. Boknik vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Münster danke ich für das Interesse und die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen zur PP5.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für die Mithilfe im Labor und die freundliche Arbeitsatmosphäre danken. Bei Frau C. Geisler möchte ich mich für die Durchführung der Experimente mit dem isolierten perfundiertem Herzmodell bedanken. Frau I. Adler möchte ich für die Präparation der Herzmuskelzellen danken. Frau. J. Wehde danke ich für die Durchführung der Northern Blots.

Frau S. Kilka von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle danke ich für die Bereitstellung des rekombinanten [<sup>33</sup>P]-markierten DARPP-32. Bei Dr. M. Weiwad und Frau H. Klemens möchte ich mich für die Möglichkeit und Unterstützung bei der Großpräparation der PP5 und bei verschiedenen Phosphatase-Assays bedanken. Dr. F. Erdmann danke ich für die Bereitstellung des pcDNA 4/HisMax-A-Plasmids.

Dr. S. Rothmund vom IZKF Leipzig danke ich für die Synthese und Bereitstellung der membrangebundenen Peptide.

Bei Dr. D. Volke und Prof. R. Hoffmann vom Biotechnologisch-Biomedizinischem Zentrum der Universität Leipzig möchte ich mich für die 2D-Gelelektrophoresen und die massenspektrometrischen Untersuchungen bedanken.

Prof. Dr. R.-E. Silber von der Universitätsklinik für Herz und Thoraxchirurgie danke ich für die Bereitstellung von menschlichen Herzbiopsien.

Bei Prof. Dr. L. Jones von der Indiana University (Indianapolis, USA) möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Antikörpern bedanken.

Besonders danken möchte ich meiner Familie für die immerwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

---

Name: Werner  
 Vorname: Franziska  
 Geboren am: 13.08.1979  
 Geburtsort: Staßfurt  
 Staatsang.: deutsch  
 Familienst.: ledig

### Schulische und berufliche Ausbildung:

---

1998: Abitur  
 1998 – 2004: Biologie-Studium (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Zoologie, Genetik, Biochemie, Immunologie und Psychologie)  
 07-2003 – 05-2004: Diplomarbeit über „Vergleichende Untersuchungen zum paternalen Verhalten der Kurzschwanz-Zwerghamster *Phodopus campbelli* (Thomas, 1905) und *P. sungorus* (Pallas, 1773)“ (Prof. Dr. R. Gattermann (Arbeitsgruppe Allgemeine Zoologie/Verhaltensbiologie, Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)  
 2004: Abschluss als Diplom-Biologin  
 ab 01-2005: Arbeit an Doktorarbeit: Bedeutung und Substrate der Protein-Phosphatase 5 im Säugetierherzen

### Wissenschaftliche Tätigkeit:

---

11-2004 – 01-2005: wissenschaftliche Tätigkeit/Hospitation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Universität Münster)  
 01-2005 – 12-2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Arbeitsgruppe Prof. J. Neumann, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)  
 ab 06-2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig, Abteilung Zelltherapie - Wirkstoffe (Dr. J. Boltze)

---

## Publikationsverzeichnis

- Gergs U, Werner F, Großmann C, Schreier B, Gekle M, Loppnow H, Neumann J** (2009) Involvement of PP5 in cardiac response to LPS-induced sepsis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379 (suppl. 1): 263
- Mettke-Hofmann C, Lorentzen S, Schlicht E, Schneider J, Werner F** (2009) Spatial Neophilia and Spatial Neophobia in Resident and Migratory Warblers (*Sylvia*). *Ethology* 115: 482-492
- Neumann J, Ebelt H, Klöckner U, Böckler A, Günther S, Baumann M, Schulz N, Werner F, Gergs U** (2008) The human serotonin 5-HT4a receptor. *Circulation* 117: P48
- Werner F, Gergs U, Neumann J** (2008) The role of PP5 in cardiac contractility. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377 (suppl 1): 55
- Gergs U, Werner F, Rothmund S, Boknik P, Schmitz W, Neumann J** (2007) On the role of protein phosphatase 5 in the heart. *Experimental Biology* 732: 1
- Werner F, Gründker N, Boknik P, Gergs U, Rothmund S, Schmitz W, Neumann J** (2007) Protein phosphatase 5 substrates in the mammalian heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375 (suppl 1): 62
- Gergs U, Schulz N, Rückschloss U, Werner F, Neumann M, Schmitz W, Neumann J** (2006) Overexpression of the human serotonin 5-HT4A receptor in the mouse heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372 (suppl 1): 89
- Werner F, Neumann S, Gattermann R** (2003) Dwarf hamsters (*Phodopus campbelli* and *Phodopus sungorus*): biparental mammal species?. Fifth Graduate student-meeting of the Ethological and the German zoological society. Bielefeld

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Halle, 25.11.2009