

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen  
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. J. Neumann)

## **Altersabhängige Expression Ca<sup>2+</sup>-regulierender Proteine im menschlichen Herzvorhof**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frank Langguth

geboren am 04.03.1965 in Halle/S.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Joachim Neumann
2. Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen
3. Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller, Münster

07. 07. 2015

02. 06. 2016

**Referat**

Die Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums Calsequestrin 2, Phospholamban und SERCA2a sind wichtig für die Aufrechterhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Veränderungen in ihrer Zusammensetzung und Funktion können zu einer Verminderung der Kontraktilität der Herzmuskulatur und somit zur Herzinsuffizienz führen.

Die Zielsetzung dieser Studie war die Untersuchung der altersabhängigen Expression dieser Proteine. Dafür wurden 53 Proben aus dem Vorhofmyokard männlicher Patienten mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren und einem mittleren NYHA-Stadium 2 ( $\pm 0,4$ ) mit dem Western Blot-Verfahren untersucht.

Alle Patienten waren mit einer kardialen Vormedikation mit  $\beta$ -Blockern vorbehandelt worden, der überwiegende Teil auch mit ACE-Hemmern oder AT1-Antagonisten, Acetylsalicylsäure (ASS) und Statinen.

Eine lineare Korrelation für die Altersabhängigkeit der Expression konnte für keines der untersuchten Proteine nachgewiesen werden, wohl aber signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Außerdem konnte eine geringe negative Korrelation zwischen ASS und Phospholamban festgestellt werden.

Für eindeutige Aussagen wären Untersuchungen größerer Fallzahlen erforderlich und zusätzlich vergleichende Proben von Ventrikelmyokard.

Langguth, Frank: Altersabhängige Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine im menschlichen Vorhofmyokard, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 62 Seiten, 2016

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
1.1 Calcium-Homöostase.....	2
1.2 Calsequestrin 2 .....	4
1.3 SERCA2a.....	6
1.4 Phospholamban .....	7
2 Zielstellung.....	10
3 Material und Methodik.....	11
3.1 Patientenkollektiv .....	11
3.2 Probengewinnung .....	11
3.3 Herstellung von Gewebehomogenaten .....	12
3.4 Proteinbestimmung nach Lowry.....	12
3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	12
3.6 Immunoblot .....	13
3.6.1 Western Blot .....	13
3.6.2 Ponceau-Färbung .....	13
3.6.3 Immunfärbung.....	14
3.6.4 Quantifizierung der Proteinsignale mittels Fluoreszenz.....	14
3.6.5 Darstellung der Proteinsignale mittels Farbreaktion .....	14
3.7 Statistische Auswertung.....	15
4 Ergebnisse .....	16
4.1 Validierung der Methoden.....	16
4.2 Analyse der Patientenproben .....	22
5 Diskussion.....	33
5.1 Veränderungen der Expression bei Erkrankungen .....	33
5.2 Altersabhängigkeit Calsequestrin 2 .....	36
5.3 Altersabhängigkeit SERCA2a .....	36
5.4 Altersabhängigkeit Phospholamban .....	38
5.5 Einfluss der Medikamenteneinnahme.....	40
6 Zusammenfassung .....	42
7 Literaturverzeichnis.....	43

8	Anhang.....	55
8.1	Patientendaten.....	55
8.2	Puffer und Lösungen.....	57
8.3	Molekulargewichtsstandard .....	58
8.4	Geräte und Bezugsquellen .....	59
8.4.1	Chemikalien .....	59
8.4.2	Geräte .....	60
8.5	Antikörper.....	60
9	Thesen .....	62
10	Lebenslauf	
11	Selbstständigkeitserklärung	
12	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
11	Danksagung	

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1	Angiotensinrezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-toloniumphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum (Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
CSQ	Calsequestrin
d. h.	das heißt
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion des Herzen in %
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
evtl.	eventuell
g	Gramm
h	Stunde
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kDa	Kilo-Dalton
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
µg	Mikrogramm

---

µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NBT	Nitroblau Tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
NYHA	New York Heart Association
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
pH	$-\log [H^+]$
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PDE	Phosphodiesterase
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor ( $Ca^{2+}$ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels (Standard Error of Mean)
SERCA	$Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SL	Sarkolemma
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences, benutzte Version SPSS 14.01; 2006, SPSS Inc., Chicago, USA
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
Tn	Troponin
TnC	Calcium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)

TRD	Triadin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v. a.	vor allem
Vol	Volumen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## **1 Einleitung**

Fortschritte in der medikamentösen Behandlung der Herzinsuffizienz haben in den letzten Jahren zu einer verringerten Sterblichkeit geführt, trotz stetiger Zunahme der Inzidenz und Prävalenz für diese Erkrankung. Infolgedessen steigt die Notwendigkeit der Erforschung neuer Therapieansätze für die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz. In den USA sind ca. 4,7 Millionen Menschen von Herzinsuffizienz betroffen (1,5%-2% der Gesamtbevölkerung) mit ungefähr 550.000 neu diagnostizierten Fällen im Jahr. Die Prävalenz der symptomatischen Herzinsuffizienz in den USA ist gleich der europäischen Bevölkerung und steigt mit zunehmendem Alter an (Hasenfuss et al., 2014). Für Deutschland und Europa wird insgesamt eine Prävalenz von 1-2% der erwachsenen Bevölkerung angenommen mit allerdings starker Altersabhängigkeit. So beträgt die Prävalenz bei 70 jährigen etwa 10% (Hummel et al., 2014). Untersuchungen zur Herzinsuffizienz im Rahmen der CARLA-Studie, die in Halle/S an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt wurde, belegen eine überproportionale ostdeutsche altersspezifische Prävalenz der Herzinsuffizienz mit und ohne Verminderung der Ejektionsfraktion für beide Geschlechter. Dabei stieg die Prävalenz von 3 % der 45-54 jährigen auf 22% der 75-83 jährigen Studienteilnehmer an (Tiller et al., 2013). Die Herzinsuffizienz wird durch ätiologisch unterschiedliche Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie, Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus oder Infektionen mit resultierender Entzündung und möglicherweise auch durch Alterungsprozesse im Zellstoffwechsel und hier insbesondere des Calciumstoffwechsels verursacht. Mag auch die ätiologische Differenzierung der Herzinsuffizienz in der Akutphase einen Sinn machen, verwischen diese im Laufe der Chronifizierung und die Symptome der Patienten gleichen sich. Herzinsuffizienz mit erhaltener systolischer Funktion wird häufiger im höheren Lebensalter und bei Frauen diagnostiziert (Schwartz et al., 2014).

Herzinsuffizienz kann als eine fortschreitende Störung gesehen werden, ausgelöst durch ein Schlüsselereignis, welches entweder den Herzmuskel schädigt, mit einem resultierenden Verlust funktionierender Herzmuskelzellen oder mit einer Störung der Fähigkeit des Myokards, Kraft zu entwickeln. Somit hindert die Herzinsuffizienz das Herz an einer normalen Kontraktion. Das Schlüsselereignis kann plötzlich eintreten, wie im Falle eines Herzinfarktes, es kann einen graduellen und schleichenden Beginn haben, wie im Fall hämodynamischer Druck- oder Volumenüberlastung, es kann aber auch ererbt sein, wie im Fall von vielen genetisch bedingten Kardiomyopathien. Ungeachtet der Natur des auslösenden Ereignisses, in irgendeiner Art und Weise



verursacht dieses einen Rückgang der Pumpkapazität des Herzens (Hasenfuss et al., 2014). Eine für alle verbindliche Definition für die Herzinsuffizienz gibt es somit nicht. Die Einteilung des Schweregrades der Herzinsuffizienz von I-IV (Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung im Stadium I bis zum Stadium IV mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe) folgt dem Schema der New York Heart Association (NYHA) wie in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) publiziert (McMurray et al., 2012). Etwa die Hälfte der Patienten mit Herzinsuffizienz weist eine relevante Erniedrigung der linksventrikulären Auswurfraction(LVEF) auf. Folgen für die Patienten sind klinisch die verringerte körperliche Belastbarkeit, Dyspnoe als Leitsymptom und Herzrhythmusstörungen. Trotz der Einführung medikamentöser Therapien konnte die 5-Jahres-Mortalität nur auf ca. 50% gesenkt werden, allerdings bei deutlich gesenkter Rehospitalisierungsrate (Hummel et al., 2014). Grundlage neuer Therapieoptionen ist daher das Verständnis der Calcium-Stoffwechselfvorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene (Hulot et al., 2012). Ein zentraler Regulator der kardialen Kontraktilität ist das intrazelluläre Calcium, und es scheint von zunehmender Bedeutung zu sein, dass altersbedingte Veränderungen in der myozytären  $Ca^{2+}$ -Regulation zu mechanischer Dysfunktion und Herzrhythmusstörungen mit konsekutiver Herzschwäche führen (Bers, 2000).

### 1.1 Calcium-Homöostase

$Ca^{2+}$  spielt eine zentrale Rolle bei der elektromechanischen Kopplung in der Herzmuskelzelle. Im Rahmen der Depolarisation der Herzmuskelzellmembran gelangt  $Ca^{2+}$  über L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle in das Zytoplasma des Kardiomyozyten und aktiviert die weitere Freisetzung von  $Ca^{2+}$  durch den  $Ca^{2+}$ -Freisetzungskanal (Ryanodinrezeptor; RyR) des junktionalen sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Fabiato et al., 1975, Sham et al., 1995). Der kardiale Ryanodinrezeptor (Typ2) steht wiederum in funktionellem Kontakt zu Triadin (Guo et al., 1996) und Junctin (Jones et al., 1995), zwei transmembranären Proteinen des junktionalen SR, deren Funktionen  $Ca^{2+}$ -abhängig reguliert werden (Zhang et al., 1997). Die  $Ca^{2+}$ -Affinität des Ryanodinrezeptors wird darüber hinaus durch das FK506-bindende Protein (FKBP12.6) reguliert (Übersicht: (Bers, 2004)). Die Wiederaufnahme von  $Ca^{2+}$  in das freie SR erfolgt während der Relaxation durch die SR- $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA2a), die wiederum durch Phospholamban reguliert wird (Simmerman et al., 1998). Eine Phosphorylierung von Phospholamban nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation verringert seine inhibierende Wirkung auf die Aktivität von SERCA2a und führt zu einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Affinität dieser  $Ca^{2+}$ -Pumpe und schließlich zu einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in das

SR. Die Folge ist eine Beschleunigung der Relaxation (Luo et al., 1994, Simmerman et al., 1998). Im SR wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Bindung an Calsequestrin 2 (Scott et al., 1988) transient gespeichert. Daneben wird zytoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$  über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach extrazellulär transportiert. Diese Fakten lassen vermuten, dass Störungen der intrazellulären und/oder SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase sowohl mit einer kontraktile Herzinsuffizienz, als auch mit einer erhöhten Arrhythmieeigung verbunden sein könnten. Eine Störung des Expressionsgrades von Genen, die wesentlich an der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligt sind, wurde bei chronischer Herzinsuffizienz beobachtet (Hasenfuss et al., 2014). Unter normalen Bedingungen gelangen  $\text{Ca}^{2+}$  vom extrazellulären Raum entlang eines großen elektrochemischen Gradienten in die Muskelzellen. Mit einem normalen Ruhepotential von -80 mV und mit einem normalen intrazellulären Natriumspiegel ist die Energie des elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten stark genug, ungefähr 20% des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma mittels des NCX zu entfernen (Hasenfuss et al., 2014). Bei Herzinsuffizienz sind die mRNA, die Proteinspiegel und die Aktivitätsspiegel des NCX gesteigert (Hasenfuss et al., 2014). Es wird vermutet, dass die steigende Expression des NCX durch die sinkende  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aufgrund der Reduktion der SERCA2a-Aktivität bei Herzinsuffizienz kompensiert wird. Der Calciumeintritt per Umkehrmodus des NCX könnte zu einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei Herzinsuffizienz führen (Hasenfuss et al., 2014). So wurde eine verstärkte Expression des NCX gemessen. Im Gegensatz dazu war die Expression der SERCA2a und des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals vermindert. Veränderungen der myokardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase schließen die verminderte oder verspätete Inaktivierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ Kanal ein, senken oder verzögern die intrazelluläre Aufnahme von ionisierten Calcium durch das sarkoplasmatische Retikulum der Kardiomyozyten und vermindern oder verzögern die auswärts gerichtete, gleichsinnige Kalium-Aktivierung (Hasenfuss et al., 2014). Das Ergebnis ist eine Verlängerung des Aktionspotentials und ein einwärts gerichteter  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom mit Verlängerung, sowohl der Kontraktion, als auch der Relaxation (Schwartz et al., 2014). Klassische Studien an explantierten herzinsuffizienten Herzen haben gezeigt, dass Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz eine Verlängerung des Aktionspotentials mit einer verminderten Kraftentwicklung und verminderten Relaxation zeigen. Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient zeigte, wie durch den fluoreszierenden Indikator Fura-2 geschätzt, einen abgeschwächten Anstieg nach Depolarisation, die erniedrigte Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  für den kontraktile Apparat widerspiegelnd( aufgrund der niedrigeren Aktivierung), gefolgt von einer verminderten Geschwindigkeit des Abfalls während der Repolarisation (aufgrund der verminderten Relaxation) (Übersicht: Hasenfuss et al., 2014).

In **Abbildung 1** ist, in vereinfachter Form, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase schematisch dargestellt.

## 1.2 Calsequestrin 2

Calsequestrin ist ein Glykoprotein, welches erstmals in den 1970er Jahren aus dem SR von Kaninchenskelettmuskeln isoliert wurde (MacLennan et al., 1971). Einige Jahre später konnte eine Herzmuskel-spezifische 53 kDa große Isoform (Calsequestrin 2) identifiziert werden (Campbell et al., 1983). Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten die Lokalisierung von Calsequestrin in den terminalen Zisternen des junktionalen SR zeigen (Franzini-Armstrong et al., 1987). Calsequestrin bindet an den RyR im SR über die Membranproteine Triadin und Junctin. Es wird ein trimere Komplex mit Calsequestrin 2 gebildet, der in die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung involviert ist (Scriven et al., 2000).

Die Bedeutung von Calsequestrin 2 ist klarer geworden durch die Etablierung transgener Mäuse, die Calsequestrin 2 unter der Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promoters gezielt im Herzen überexprimieren (Jones et al., 1998, Sato et al., 1998). Es kam zu einer kardialen Hypertrophie und einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Erweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums. Die Größe isolierter Zellen war erhöht. Die Expression von Calsequestrin 2 war etwa verzehnfacht, aber kompensatorisch kam es zu einer verminderten Expression von RyR, Triadin und Junctin (Jones et al., 1998). Die Mortalität der Tiere war erhöht. Die physiologische positive Kraft-Frequenz-Beziehung war, wie bei Trabekeln aus insuffizienten menschlichen Herzen, durch eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung ersetzt (Schmidt et al., 2000). Ferner beobachtete man Arrhythmien in Form von AV Blockierungen (I° bis III°) und ein verlängertes PR- und QT-Intervall (Knollmann et al., 2000). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung war in den transgenen Kardiomyocyten vermindert, was auf eine verminderte Effizienz der elektromechanischen Kopplung deuten kann. Umgekehrt führte vermindertes zelluläres Calsequestrin 2 (durch Überexpression von „Antisense“-DNA) zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und verminderter Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Viatchenko-Karpinski et al., 2004). Somit könnte der RyR über Calsequestrin 2 erfahren, welche freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im SR herrscht und durch Öffnung versuchen, diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konstant zu halten (Bers, 2004). Im Jahr 2001 wurde erstmals eine Mutation im Calsequestrin-Gen (D307H) beim Menschen mit der autosomal rezessiven Form der Katecholamin-induzierten polymorphen ventrikulären Tachykardie (CPVT) in Verbindung gebracht (Lahat et al., 2001).

Mittlerweile wurden noch weitere Mutationen im Calsequestrin-Gen gefunden, die im homozygoten Zustand entweder zum Fehlen von Calsequestrin 2 oder zu einer verminderten Funktion führen und mit dem Auftreten von CPVTs korrelieren (Postma et al., 2002, Kim et al., 2007). In sieben Familien eines Beduinenstammes wurden 9 Fälle von plötzlichem Herztod und bei 12 anderen Kindern wiederholte Synkopen und Ereignisse, beginnend mit einem Alter von 6 ( $\pm 3$ ) Jahren, beobachtet. Typische EKG-Veränderungen traten nur bei Belastung oder bei akutem emotionalen Streß in Form von bidirektionalen ventrikulären Tachykardien auf, die durch eine Schlag zu Schlag 180°-Rotation des QRS-Komplexes charakterisiert waren (Faggioni et al., 2012). In vitro Versuche mit gereinigtem mutierten Calsequestrin 2 bzw. Expression von mutiertem Calsequestrin 2 in isolierten Kardiomyozyten haben nahegelegt, dass die arrhythmogenen Calsequestrinmutationen zu Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, entweder durch verringerte Pufferkapazität und/oder durch Beeinflussung des RyR, führen (Viatchenko-Karpinski et al., 2004). Neuere Untersuchungen an homozygoten und heterozygoten Calsequestrin 2-Knockout-Mäusen, die entweder kein oder weniger Calsequestrin exprimierten, haben überraschende Erkenntnisse zur Bedeutung von Calsequestrin geliefert. Calsequestrin 2-Knockout-Mäuse waren lebensfähig und zeigten unter basalen Bedingungen eine normale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und eine normale kardiale Kontraktilität (Knollmann et al., 2006). Auffällig war eine histologisch sichtbare Volumenerweiterung des sarkoplasmatischen Retikulums. Weiterhin waren die Calsequestrin-bindenden Proteine Triadin und Junctin stark herabreguliert. In vivo konnten unter Streß Arrhythmien beobachtet werden, wie sie auch bei Menschen mit Nullmutationen im Calsequestrin 2 -Gen auftreten. Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass Calsequestrin 2 nicht zwingend notwendig für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum ist. Die primäre Aufgabe von Calsequestrin scheint die Hemmung des RyR-Kanalkomplexes unter erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung z.B. nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu sein. Dies dient dazu, spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen zu verhindern und somit auch unter Streßsituationen (Katecholaminfreisetzung) einen geregelten Herzrhythmus sicherzustellen (Knollmann et al., 2006, Chopra et al., 2007). Interessanterweise scheinen alle bisher durchgeführten Untersuchungen darauf hinzudeuten, dass die Proteinexpression von Calsequestrin 2, sowohl bei menschlicher Herzinsuffizienz, als auch bei Tiermodellen der Herzinsuffizienz, unverändert ist (Munch et al., 1998).

### 1.3 SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a)

Die SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Herzens (SERCA2a) ist ein 110 kDa großes Membranprotein mit zehn Transmembrandomänen und mit der bedeutendste Regulator der kardialen Muskelkontraktilität und Ca<sup>2+</sup>-Homöostase. SERCA2a hält einen tausendfachen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten entlang der kardialen Membran des sarkoplasmatischen Retikulums aufrecht (Frank et al., 2003).

Der diastolische Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport vom Zytosol in das SR erfolgt unter Energieverbrauch (ATP) durch die SERCA2a Isoform, der vorherrschenden der fünf bekannten Isoformen (SERCA1a, SERCA1b, SERCA2a, SERCA2b, SERCA3), die sowohl im gesunden als auch im geschädigten Herzen vorkommt (Frank et al., 2003). In Herzen von höheren Säugern (einschließlich des Menschen) werden während der Diastole etwa 70-80% des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> über die SERCA2a in das SR gepumpt. Die restlichen 20-30% werden über den sarkolemmalen NCX aus der Zelle heraus befördert. (Bers et al., 1996).

Das akkumulierte Ca<sup>2+</sup> wird im SR durch Bindung an Calsequestrin 2, Calreticulin und histidinreiches Bindungsprotein gespeichert (Frank et al., 2002).

Außerdem spielt die SERCA2a eine zentrale Rolle beim „Handling“ des im sarkoplasmatischen Retikulum befindlichen Ca<sup>2+</sup>, SERCA2a ist das entscheidende Protein bei der Wiederherstellung des diastolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels und beendet die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kraftaktivierung.

Die Funktion und Ca<sup>2+</sup>-Aktivierung von SERCA2a kann durch verschiedene indirekte und direkte Faktoren beeinflusst werden. Der wichtigste indirekte Mechanismus erfolgt über das regulatorische Protein Phospholamban (PLB), welches mit SERCA2a assoziiert ist und die Affinität von SERCA2a zu Ca<sup>2+</sup> in seiner dephosphorylierten Form hemmt. Direkt wird SERCA2a unter anderem durch die CaMK II reguliert, wodurch die Kapazität des Ca<sup>2+</sup>-Transportes erhöht wird, sowie Schilddrüsenhormone, Insulin und Nitrosylierung (Frank et al., 2003).

Gendefekte in Form verminderter Expression von SERCA2a führten zu einer verminderten Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das sarkoplasmatischen Retikulum. Eine moderate Überexpression von SERCA2a bei transgenen Mäusen führte zu einem gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Transport und gesteigerter Kontraktilität und Relaxation der Herzmuskulatur ohne sichtbare kardiale Pathologie. Die Abwesenheit des SERCA2a-Gens war dagegen letal bei homozygoten Mäusen in der frühen Entwicklungsphase. Heterozygote Mäuse waren lebensfähig, zeigten jedoch eine 33%ige Verminderung der SERCA2a Proteinmenge als Ergebnis des Verlusts eines Allels, mit verminderter Kontraktilität der Herzmuskelzellen (Schultz et al., 2004).

Herzinsuffizienz ist beim Menschen mit deutlichen Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und in den Calcium-Austauschsystemen assoziiert. Als primärer Mechanismus werden Veränderungen in der Expression und Funktion der Proteine der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase angenommen. Ungeklärt sind bisher, wie sich Proteinmenge und Funktion von SERCA2a im menschlichen insuffizienten Myokardgewebe verändern. Veränderungen des mRNA-Levels gehen mit Veränderungen der SERCA2a-Proteinexpression einher. Verschiedene Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Proteinmenge von SERCA2a. Bei einigen wurde eine Verminderung der Expression beobachtet, bei anderen nicht. Zusätzlich zeigte die Mehrheit der Studien Phospholamban, als Hauptregulator der SERCA2a-Funktion, im Säugetierherz unverändert. War die Proteinexpression von SERCA2a im menschlichen Herz verringert, kam es zu einer Verschlechterung der Aktivität der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion, sowohl im gesunden als auch im insuffizienten Herzgewebe (Frank et al., 2002).

#### 1.4 Phospholamban

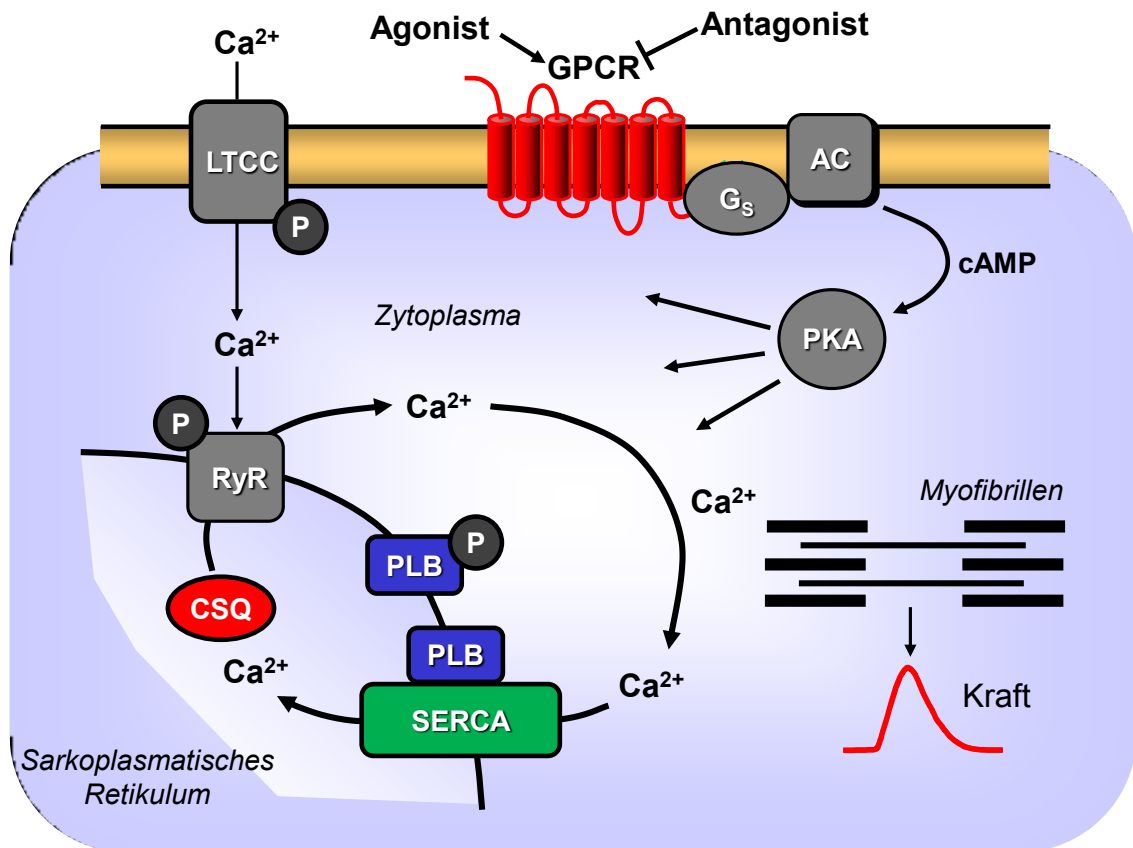
Phospholamban (PLB), ein Membranprotein mit einer Membrandomäne und nur 52 Aminosäuren (ca.6 kDa) groß, ist eines der wichtigsten Proteine, welches nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation phosphoryliert wird und ist ein bedeutender Regulator der kardialen Kontraktilität (Lindemann et al., 1983). Im nicht phosphorylierten Zustand vermindert PLB die kardiale Kontraktilität durch Hemmung der Aktivität der SERCA2a, durch Erniedrigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität an den zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen der SERCA2a. PLB kann an drei Stellen in vitro phosphoryliert werden, an Serin-16 durch cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen, an Threonin-17 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und an Serin-10 durch die Proteinkinase C (PKC) (Movsesian et al., 1984, Simmerman et al., 1986, Huggins et al., 1989). Die Serin-10-Phosphorylierung durch PKC tritt im intakten Herzen allerdings nicht auf (Edes et al., 1991).

Die Phosphorylierung von PLB an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 hebt die Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2a weitgehend auf und verstärkt somit die kardiale Kontraktilität (Wegener et al., 1989, Simmerman et al., 1998, Young et al., 2004). In-vivo-Studien an Mäusen mit Entfernung (Knock-out) oder Überexpression von PLB haben gezeigt, dass dephosphoryliertes Phospholamban tatsächlich ein Inhibitor der SERCA2a ist und Phosphorylierung diese Hemmung wieder aufhebt. Bei menschlicher und experimentell verursachter Herzinsuffizienz wird die Aktivität der

Typ-1-Phosphatase deutlich erhöht, mit Dephosphorylierung von Phospholamban und Hemmung der SERCA2a (Vafiadaki et al., 2013).

Experimente mit Ausschalten der PLB-Expression in Knockout-Mäusen führten im Ergebnis zu einer Steigerung der Affinität der SERCA2a für  $\text{Ca}^{2+}$  und zu einer Steigerung der Kontraktion und Relaxation (Luo et al., 1994). Umgekehrt führte die Überexpression von PLB zu einer sinkenden  $\text{Ca}^{2+}$  Affinität von SERCA2a, verminderter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ladung und verminderter kardialer Kontraktilität (Kadambi et al., 1996). Studien an Herzmuskelzellen, Organen und intakten Tieren mit fehlendem Phospholamban, zeigten eine deutliche Abschwächung der inotropen und lusitropen Effekte von Isoprenalin, einem  $\beta_1$ -Adrenozeptoragonisten, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Das zeigte, dass Phospholamban ein wichtiger Vermittler der  $\beta_1$ -adrenergen Reaktion im Säugetierherz ist (Luo et al., 1994). Für die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) zur Phosphorylierung des Threonin-17 ist ein Ansteigen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels erforderlich. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Serin-16 Voraussetzung für die Phosphorylierung von Threonin-17 ist und die Phosphorylierung von Serin-16 ausreichend für die Vermittlung der maximalen kardialen Antwort auf  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation ist, allerdings nur in vitro (Chu et al., 2000). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von PLB nur am intakten schlagenden Herzen bei  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation möglich ist.

Änderungen der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung von Phospholamban unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Vorliegen einer Azidose, wie sie bei der akuten myokardialen Ischämie auftritt oder dem diabetischen Koma wurden beschrieben. Das Ansteigen der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Menge bei Azidose kann die spontane SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ansteigen lassen und verursacht Extrasystolen (Orchard et al., 1987). Überdies hat die Rückkehr zu normalem pH-Wert nach Laktatazidose ebenfalls arrhythmogene Wirkungen. Die Wiederherstellung des pH-Wertes induziert einen Anstieg der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Lecks. Dieser Effekt war wahrscheinlich durch eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit des RyR2-Rezeptors bedingt, aufgrund des pH-Wert-Anstiegs nach Azidose und der Azidose-induzierten Erhöhung der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, welche immer noch zu Beginn der Postazidose besteht (Said et al., 2008). Die Rückkehr zu einem normalen pH-Wert führt auch zur Wiederherstellung des durch die Azidose gehemmten NCX (Philipson et al., 1982), der Begünstigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstoßes und  $\text{Na}^+$ -Einstroms in der Zelle, zur Membrandepolarisation und schließlich zu getriggerten Arrhythmien (Said et al., 2008). Die meisten Studien am herzinsuffizienten Patienten legen nahe, dass die Expression von Phospholamban unverändert bleibt im Vergleich zum nichtinsuffizienten Herz.



**Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in der Herzmuskelzelle und deren Beeinflussung durch Aktivierung eines G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR).



## **2 Zielstellung**

Es ist bekannt, dass die Kontraktionsfähigkeit des menschlichen Herzens im Alter abgeschwächt ist, beispielsweise sind die Effekte der sympathischen Stimulation des Herzens vermindert. Die zugrunde liegenden Mechanismen, insbesondere die altersabhängigen Veränderungen der Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums SERCA2a und PLB und des in den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulum vorkommenden Calsequestrins 2, sind hingegen nur ungenügend geklärt und sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeitet werden.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Patientenkollektiv

In diese Untersuchung wurden Vorhofproben nur von männlichen Patienten ohne Schilddrüsenmedikation eingeschlossen. Als Ausschlusskriterium wurde eine ausgeprägte Herzinsuffizienz (NYHA-Stadium >3, Ejektionsfraktion (EF) <30) definiert. Da alle Patienten mehrere Medikamente einnahmen, wurde nach folgenden Kriterien selektioniert: Einschlusskriterium war die Therapie mit dem  $\beta$ -Rezeptorantagonist Metoprolol, Carvedilol oder Bisoprolol. Wenn innerhalb einer Altersgruppe mehr als 10 Patienten den genannten Kriterien entsprachen, wurden diejenigen eingeschlossen, die ein niedrigeres CCS- bzw. NYHA-Stadium und eine höhere EF aufwiesen, sowie weniger Medikamente einnahmen. Zur Überprüfung der Kriterien lagen die Patientenakten und der Operations-Begleitzettel vor. Unter Berücksichtigung der angeführten Kriterien konnten die Vorhofproben von 53 Patienten in die Studie eingeschlossen werden (siehe Anhang 8.1 und **Tabelle 1**). Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 48 und 85 Jahre alt.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Patientendaten (siehe auch Anhang)

Parameter	Mittelwert $\pm$ SEM (n = 53)
Alter	67,1 $\pm$ 1,3
NYHA-Stadium	2 $\pm$ 0,2
CCS-Klassifikation	2,3 $\pm$ 0,08
EF (%)	62,5 $\pm$ 1,6
Anzahl Medikamente gesamt	5,3
ACE-Inhibitoren u. AT1-Rezeptorantagonisten (%)	77,4
Statine (%)	73,6
ASS (%)	71,7

#### 3.2 Probengewinnung

Die Gewebeproben vom rechten Vorhof der Patienten stammten aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Halle-Wittenberg (Leitung: Prof. Dr. med. Silber). Sie wurden im Zeitraum von 1997 bis 2008 im Rahmen von Bypassoperationen entnommen. Alle Patienten wurden vor der Operation über die Entnahme und Verwendung der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung. Die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission für diese Studie lag vor. (Aktenzeichen: hm-bü

04.08.2005). Nach Entnahme des Gewebes wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis transportiert. Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie erfolgte die Lagerung der Proben bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 Herstellung von Gewebehomogenaten**

Das gefrorene ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) Herzgewebe wurde im Mikro-Dismembrator bei 2100 rpm unter flüssigem  $\text{N}_2$  pulverisiert. Eine Spatelspitze Gewebepulver (10-20 mg) wurde mit 100  $\mu\text{l}$  SDS-haltigem Homogenisationspuffer (siehe Anhang) versetzt und auf einem Schüttelmixer gemischt. Anschließend erfolgte die Homogenisation auf Eis für  $3 \times 15$  Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator gefolgt von einer Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nicht lösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 17000 rpm für 20 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  entfernt. Die Lagerung des Überstandes (= Gewebehomogenat) erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alle verwendeten Gefäße und Kleingeräte (Spatel, Pinzette) wurden vor der Verwendung in flüssigem Stickstoff gekühlt.

### **3.4 Proteinbestimmung nach Lowry**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den SDS-haltigen Gewebehomogenaten wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) mit BSA als Proteinstandard durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu II}$  zu  $\text{Cu I}$  durch die Proteine. Für den  $\text{Cu I}$  Nachweis wurde das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz verwendet. Der photometrische Nachweis fand bei 562 nm in einem Eppendorf-Biophotometer statt.

### **3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die Analyse von Proteinen wurde die Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) verwendet, bei der die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies resultiert daraus, dass das negativ geladene SDS die Proteine nicht nur denaturiert, sondern insbesondere sämtliche proteineigenen Ladungen überdeckt und damit zu einem konstanten Verhältnis von Ladung und Masse der Proteine führt. Somit wird die Wanderungsgeschwindigkeit verschiedener Proteine in einem Gel im Wesentlichen nur durch ihre Größe bestimmt. Hier kam das Gelsystem nach Porzio und Pearson (Porzio et al., 1977) zur Anwendung, das sich in der Zusammensetzung des Trenngelpuffers von anderen Systemen unterscheidet. Dieses Gelsystem, ursprünglich entwickelt zur besseren Darstellung myofibrillärer Proteine, hat sich auch zur Darstellung der hier untersuchten Proteine bewährt, da eine höhere Auflösung bei gleicher Polyacrylamidkonzentration erreicht wird.

Die Gewebehomogenate wurden mit Homogenisationspuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt, mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgefüllt und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Es wurden jeweils 55 µg Protein pro Spur geladen. Auf jedem Gel wurde ein Größenstandard, bestehend aus einem Gemisch von Markerproteinen (siehe Anhang) mit folgenden Molekulargewichten (in kDa): 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14 und eine Referenzprobe mitgeführt. Alle Gele bestanden aus einem Sammelgel (4% Acrylamid) und einem Trenngel (10% Acrylamid). Die Elektrophorese erfolgte stromkonstant mit 40 mA pro Gel im Bereich des Sammelgels und mit 50-60 mA pro Gel im Bereich des Trenngels bei 4°C in einer Hoefer SE600 Elektrophorese-Einheit bis die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Als Stromquelle wurde ein Biometra Standard Power Pack P25 benutzt.

### **3.6 Immunoblot**

#### **3.6.1 Western Blot**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Die so immobilisierten Proteine konnten für Immunfärbungen verwendet werden. Für den Blot in einer Hoefer TE-62 Transferkammer (siehe Anhang) wurde folgender Aufbau verwendet (von Kathode zu Anode): Kunststoffhalterung, Schaumstoff, Whatman 3MM Filterpapier, Gel, Membran, 3MM Filterpapier, Schaumstoff, Kunststoffhalterung. Schaumstoff, Filterpapiere und Membranen wurden zuvor mit Transferpuffer (nach (Jones et al., 1985); siehe Anhang) getränkt. Der Transfer wurde über Nacht bei 4°C und konstanter Stromstärke in Transferpuffer durchgeführt. Stromstärke und Dauer des Transfers wurden so berechnet, dass immer 4,5 Ah erreicht wurden. Danach wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt (3.6.2), um die Qualität des Transfers abzuschätzen und dann entweder in eine Immunfärbung eingesetzt oder getrocknet und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.6.2 Ponceau-Färbung**

Um sämtliche auf die Nitrozellulose transferierten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Nitrozellulose 5-10 Minuten in einer Ponceau-Färbelösung (siehe Anhang) inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff mit deionisiertem Wasser ausgewaschen. Die Ponceau-gefärbten Membranen wurden zwecks Dokumentation eingescannt. Für die weitere Verwendung der Membranen (Immunfärbung 3.6.3) wurde im Anschluss der Ponceau-Farbstoff mit TBST komplett ausgewaschen.

### 3.6.3 Immunfärbung

Bei der Immunfärbung wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (primärer Antikörper, **Tabelle 2** und Anhang) das zu untersuchende Protein auf der Membran sichtbar gemacht. Dazu mussten zunächst alle freien Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Dies erfolgte durch Inkubation der Membranen aus 3.6.2 mit einem Blockierungspuffer für 2 h schüttelnd bei RT. Danach folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C leicht schüttelnd. Im nächsten Schritt wurde nach dreimaligem Waschen (jeweils 10 min) mit TBST ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper) gegen die konstanten Bereiche des primären Antikörpers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 h in Blockierungspuffer bei RT. Der sekundäre Antikörper war mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Durch Zugabe eines Enzymsubstrats konnte die entsprechende Bande auf der Membran durch Fluoreszenz (3.6.4) bzw. durch eine Farbreaktion (3.6.5) sichtbar gemacht werden.

**Tabelle 2:** Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper (AP-gekoppelt)	Verdünnung
Anti CSQ2	1:10000	Anti rabbit IgG	1:1000
Anti SERCA2a	1:5000	Anti mouse polyvalent	1:1000
Anti PLB	1:3000	Anti rabbit IgG	1:1000

### 3.6.4 Quantifizierung der Proteinsignale mittels Fluoreszenz

Nach der Antikörperinkubation (3.6.3) wurden die Membranen 2x 10 min mit TBST gewaschen und 2x 2 min mit AP-Puffer äquilibriert bevor sie 5 min mit der Substratlösung (ECF: 1:10 in AP-Puffer verdünnt) inkubiert und dann noch einmal 2 min mit frischem AP-Puffer gewaschen wurden. Die gebildete Fluoreszenz wurde mit einem PhosphorImager (STORM 860) detektiert und die quantitative Auswertung erfolgte mit der ImageQuant-Software.

### 3.6.5 Darstellung der Proteinsignale mittels Farbreaktion

Wenn keine quantitative Auswertung benötigt wurde bzw. im Anschluss an die quantitative Auswertung (3.6.4) wurden die Banden auf den Membranen mit einer NBT-BCIP-Farbreaktion sichtbar gemacht. Dazu wurden die mit AP-Puffer äquilibrierten Membranen einige Minuten abgedunkelt mit der entsprechenden

Farblösung (66 µl NBT Stammlösung und 33 µl BCIP Stammlösung in 10ml AP-Puffer) bis zum Erreichen der optimalen Signalstärke inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Abgießen der Farblösung und Zugabe von H<sub>2</sub>O. Die Membran konnte jetzt zwecks Dokumentation eingescannt und getrocknet aufbewahrt werden.

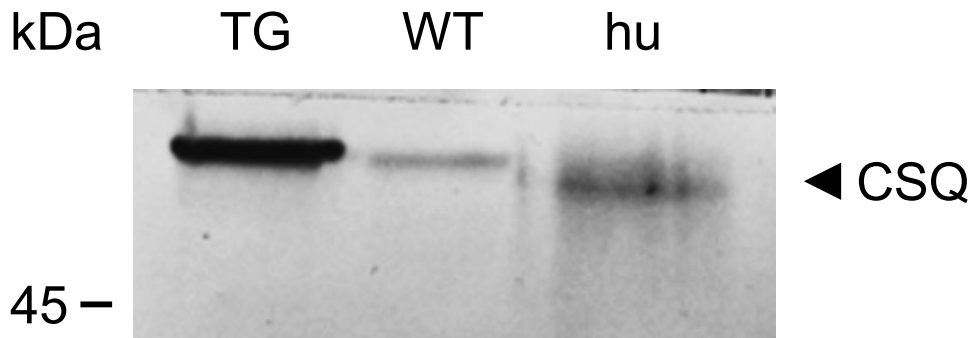
### **3.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Excel sowie SPSS. P-Werte wurden nicht für multiples Testen korrigiert und werden deshalb explorativ interpretiert. Die angegebenen Werte sind, wenn nicht anders erwähnt, Mittelwerte ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde eine Beratung durch das Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik in Anspruch genommen.

## **4 Ergebnisse**

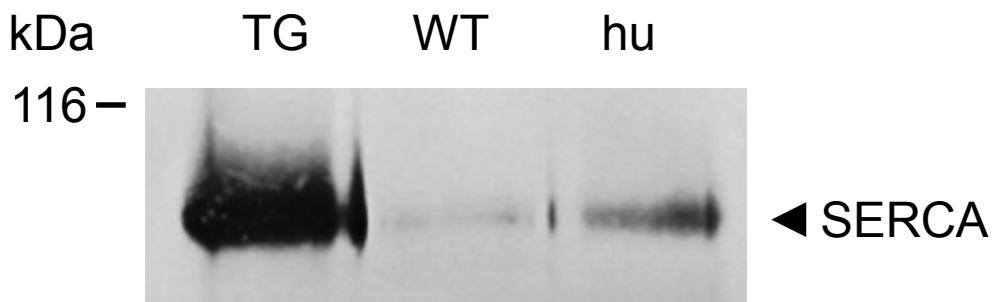
### **4.1 Validierung der Methoden**

Bevor die Patientenproben analysiert werden konnten erfolgte zunächst die Optimierung der Analysemethoden. Erstens wurde getestet ob mit den eingesetzten Antikörpern die zu untersuchenden Proteine im Western-Blot zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten. Zweitens wurde untersucht mit welcher Proteinmenge die Polyacrylamidgele beladen werden mussten um im linearen Bereich des Detektionssystems zu liegen. Für die Testung der Antikörper gegen CSQ2 und SERCA2a wurde ein Vergleich von menschlichen Herzgewebeproben mit denen von transgenen Mäusen durchgeführt. Eingesetzt wurde zum einen Herzgewebe einer Maus mit kardialer Überexpression von Hunde-CSQ2 (Jones et al., 1998). **Abbildung 2** zeigt den entsprechenden Western-Blot mit einem Signal im Größenbereich um 55 kDa. Zum Vergleich ist auch eine Wildtyp-Mausprobe dargestellt. Die Größenunterschiede der nachgewiesenen Proteine können durch Speziesunterschiede (Hund: 506 Aminosäuren, Maus: 415 Aminosäuren, Mensch: 399 Aminosäuren) erklärt werden. Für den SERCA2a-Nachweis stand Herzgewebe einer transgenen Maus mit kardialer Überexpression von Ratten-SERCA2a zur Verfügung (Baker et al., 1998). **Abbildung 3** zeigt den entsprechenden Western-Blot mit einem Signal im Bereich von 100 kDa. Für den Nachweis von PLB stand leider kein Gewebe einer Überexpressionsmaus zur Verfügung. Aber dennoch ermöglichte eine besondere Eigenschaft des PLB die eindeutige Zuordnung der Proteinbande. PLB kommt in seiner nativen Form als pentamerer Proteinkomplex (ca. 30 kDa) vor, der auch durch eine Behandlung mit SDS nicht oder nur teilweise aufgelöst wird. Erst durch Kochen der Probe zerfällt der Proteinkomplex in seine Monomere (ca. 6 kDa) (Jones et al., 1985). Somit konnte durch den Vergleich einer ungekochten mit einer gekochten Gewebeprobe die PLB-Bande zugeordnet werden (**Abbildung 4**).



**Abb. 2: Antikörpertest Maus vs. Mensch Calsequestrin.**

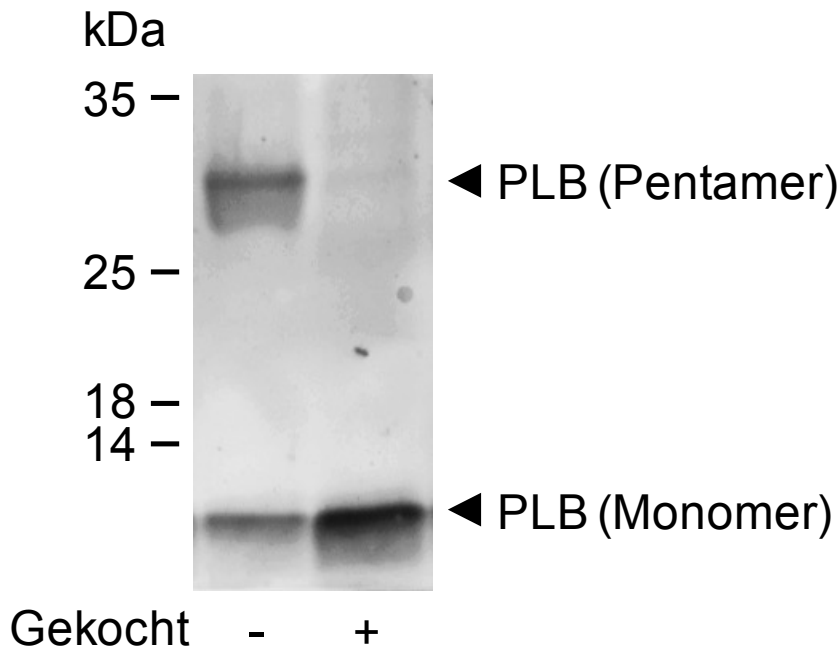
Vergleich der Signalintensität im Western-Blot für Calsequestrin (CSQ2) in Herzgewebe einer CSQ2-überexprimierenden transgenen Maus (TG), einer Wildtyp-Maus (WT) und einer menschlichen Probe (hu). Proteinbeladung 40 µg, Nachweis mit NBT/BCIP-Färbung.



**Abb. 3: Antikörpertest Maus vs. Mensch SERCA2a.**

Vergleich der Signalintensität im Western-Blot für die kardiale SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a) in Herzgewebe einer SERCA2a-überexprimierenden transgenen Maus (TG), einer Wildtyp-Maus (WT) und einer menschlichen Probe (hu). Proteinbeladung 40 µg, Nachweis mit NBT/BCIP-Färbung.

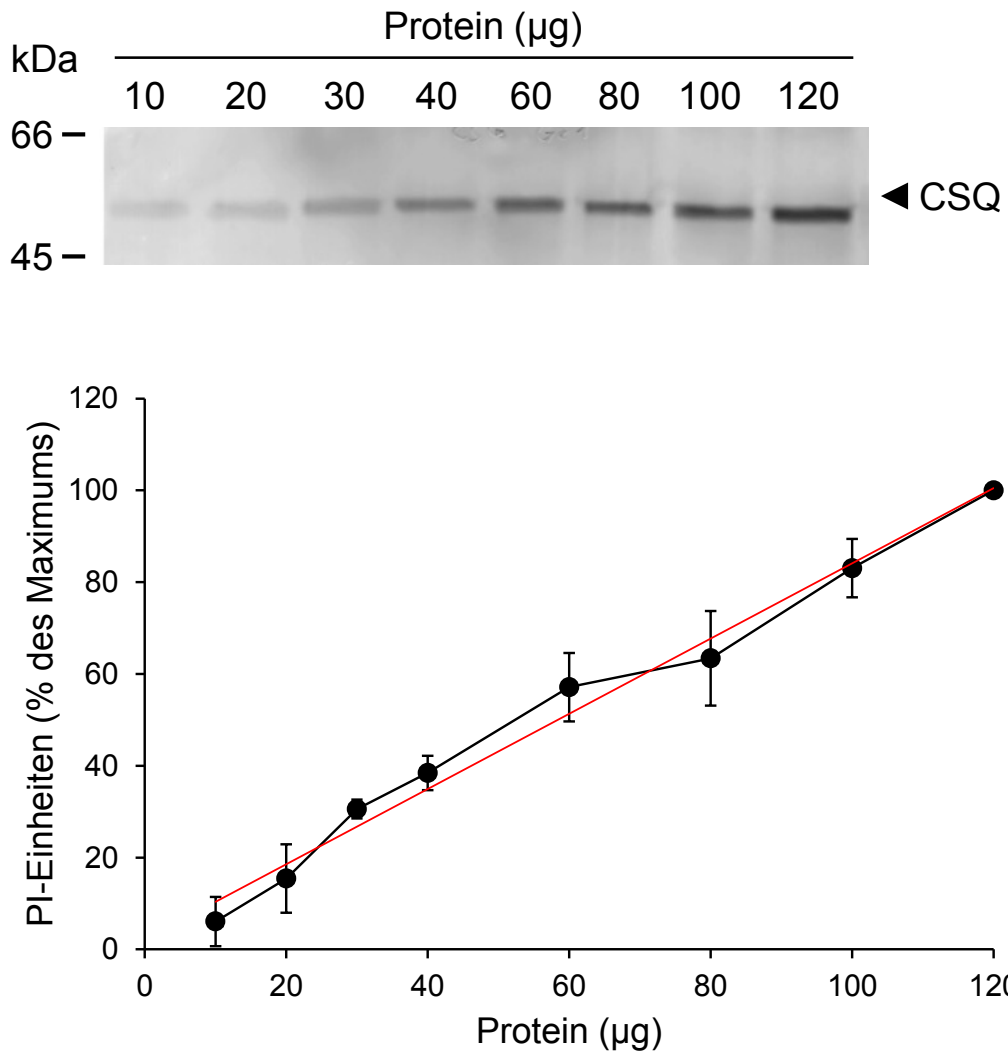




**Abb. 4: Antikörpertest PLB gekocht vs. Ungekocht**

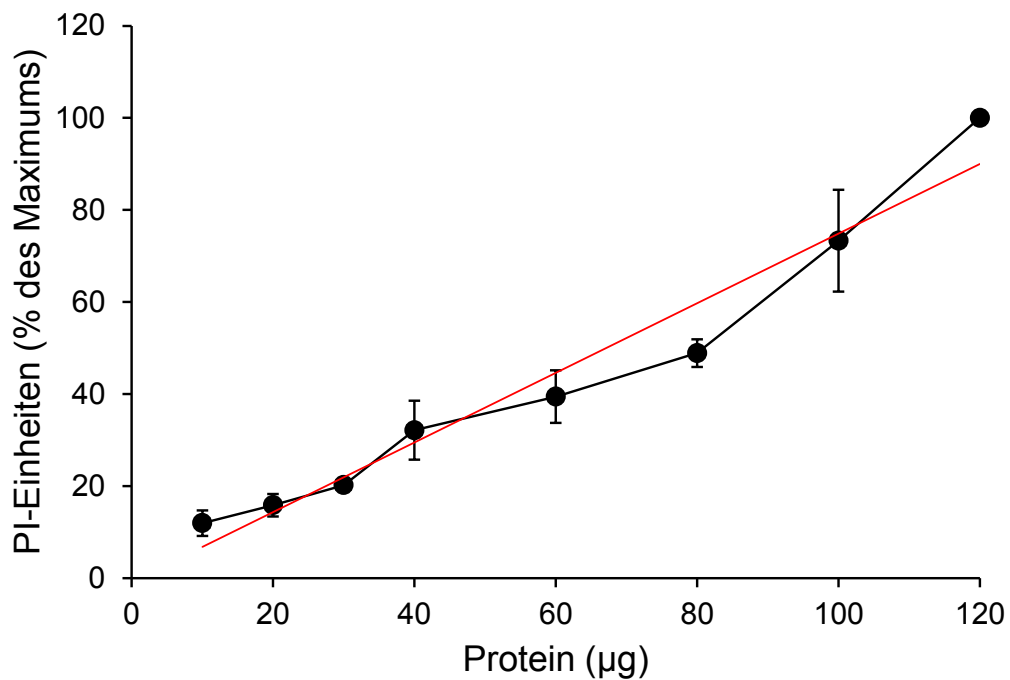
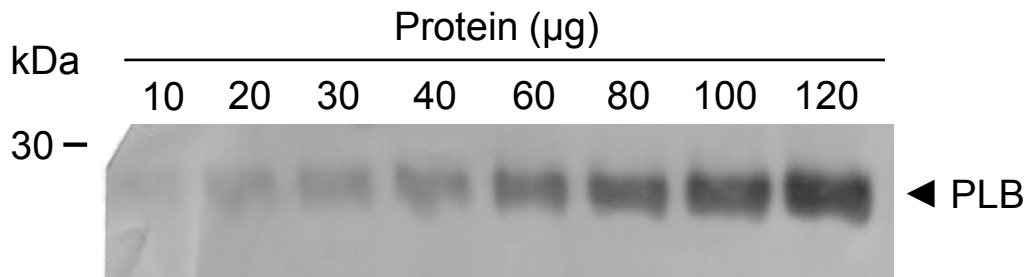
Identifikation von Phospholamban (PLB) im Western-Blot durch Vergleich einer gekochten mit einer ungekochten Herzgewebeprobe. Durch Erhitzen wird PLB von der pentameren Form in die monomere Form überführt.

Im nächsten Schritt wurde die optimale Proteinbeladung der Gele analysiert. Optimal bedeutete in diesem Fall, dass die entsprechende Proteinbande eindeutig nachweisbar sein musste und dass das Verhältnis zwischen gemessener Signalstärke (Fluoreszenzintensität) und eingesetzter Proteinmenge linear war. Zu diesem Zweck wurden Western-Blots durchgeführt, bei denen Proben mit aufsteigender Proteinmenge (10 bis 120  $\mu\text{g}$ ) eingesetzt wurden. Für jeden Antikörper wurden drei Versuche durchgeführt, die Bandenintensität gemessen und die Ergebnisse gemittelt und graphisch dargestellt. Die **Abbildungen 5 (2), 6 (PLB) und 7 (SERCA2a)** zeigen jeweils einen exemplarischen Western-Blot und die Auswertung der Daten. Für die Analyse der Patientenproben wurde eine Proteinmenge von 55  $\mu\text{g}$  pro Spur als optimal erachtet. Bei dieser Proteinmenge konnten Expressionsschwankungen in beide Richtungen eindeutig nachgewiesen werden und es stand ausreichend Material zur Verfügung um eventuell Western-Blots zu wiederholen.



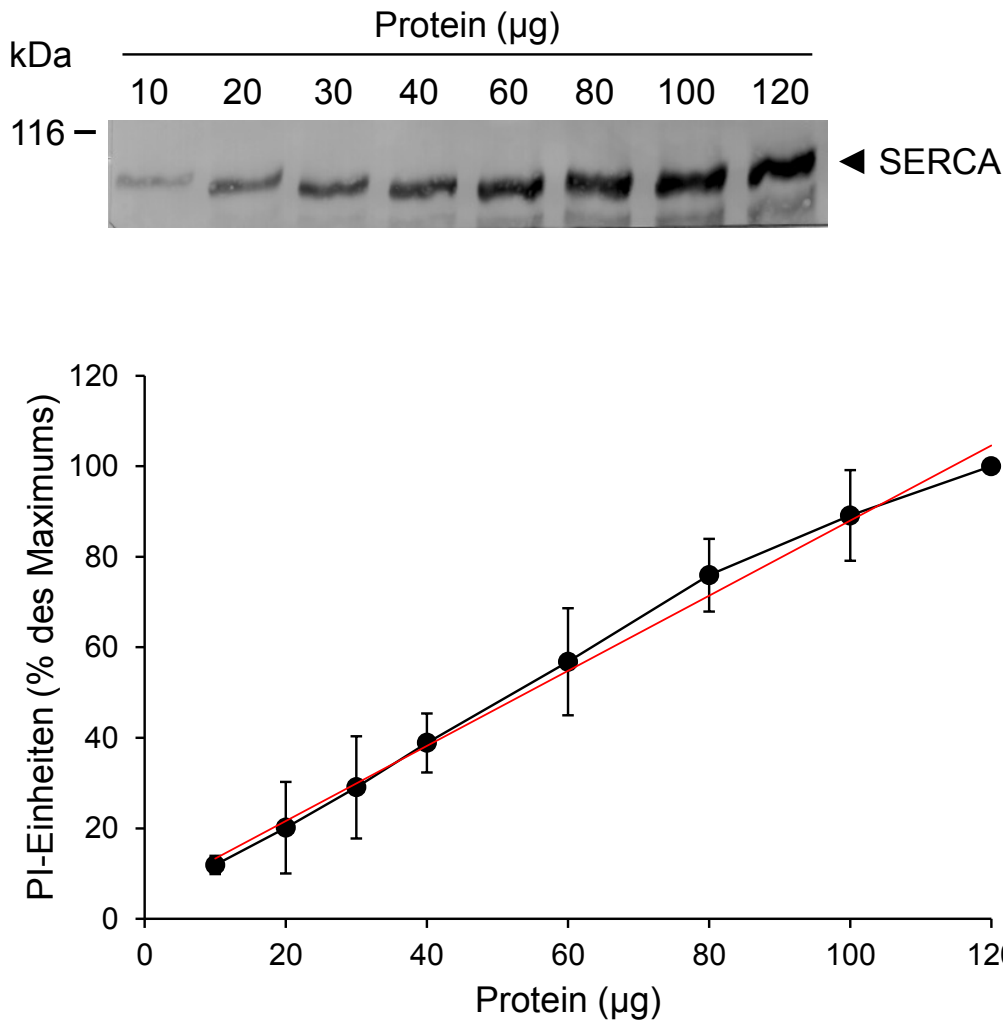
**Abb. 5: Proteinabhängigkeit für Calsequestrin.**

Proteinabhängigkeit von Calsequestrin (CSQ2) mit einer aufsteigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120 µg. Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot und die gemessene Signalintensität (PhosphorImager-Einheiten, PI) in Prozent des maximalen Wertes als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchen.



**Abb. 6: Proteinabhängigkeit für Phospholamban.**

Proteinabhängigkeit von Phospholamban (PLB) mit einer aufsteigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120  $\mu\text{g}$ . Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot und die gemessene Signalintensität (PhosphorImager-Einheiten, PI) in Prozent des maximalen Wertes als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchen.



**Abb. 7: Proteinabhängigkeit für SERCA2a.**

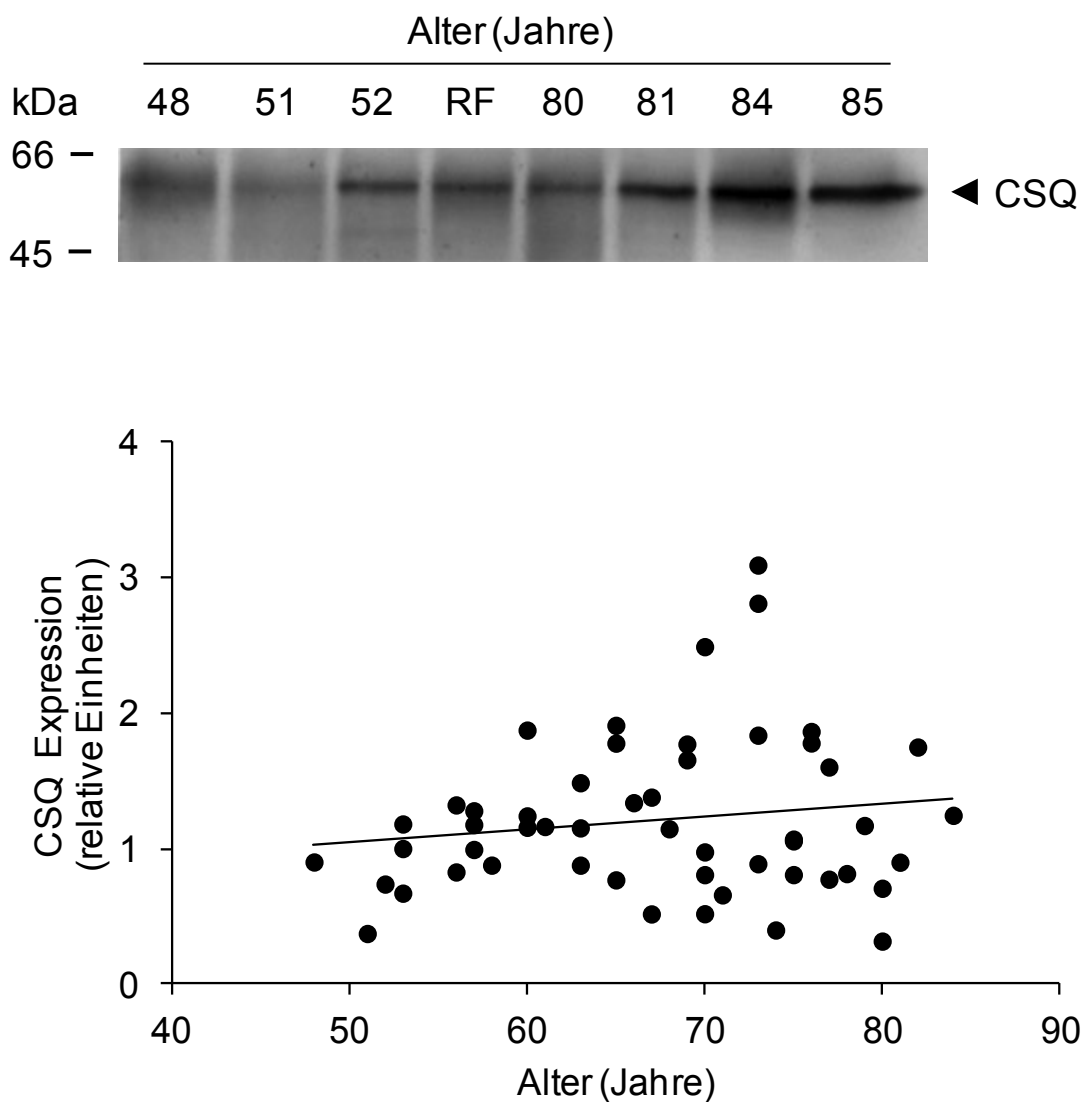
Proteinabhängigkeit von SERCA2a mit einer aufsteigenden Proteinkonzentration von 10 bis 120 µg. Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot und die gemessene Signalintensität (PhosphorImager-Einheiten, PI) in Prozent des maximalen Wertes als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Versuchen.

Ein grundsätzliches Problem bei immunologischen Nachweismethoden mit enzymatischer Signaldetektion stellt die Variabilität der Ergebnisse durch äußere Einflüsse dar. Dies bedeutet z.B., dass dieselbe Probe an unterschiedlichen Tagen gemessen immer eine andere Signalintensität liefert. Um also alle Patientenproben, die über einen Zeitraum von mehreren Monaten auf verschiedenen Nitrozellulosemembranen analysiert wurden miteinander verglichen zu können, wurde auf jedem Gel ein Aliquot einer Referenzprobe mitgeführt, die immer die gleiche Proteinmenge enthielt und somit zur Normierung der Signalintensitäten diente. Eine weitere Fehlerquelle stellte eine eventuell ungleiche Proteinbeladung der Gele durch

Pipettierfehler dar. Dies konnte durch Beurteilung der Ponceau-gefärbten Nitrozellulosemembranen weitgehend ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit auf die Proteinmenge abzugleichen bestand in der Normierung auf die CSQ2-Expression. Da laut Literatur (Munch et al., 1998) die kardiale Expression von CSQ2 konstant und unabhängig von Erkrankungen sein soll, wurden die Signalintensitäten von SERCA2a und PLB auch durch den CSQ2-Wert der entsprechenden Probe dividiert und analysiert.

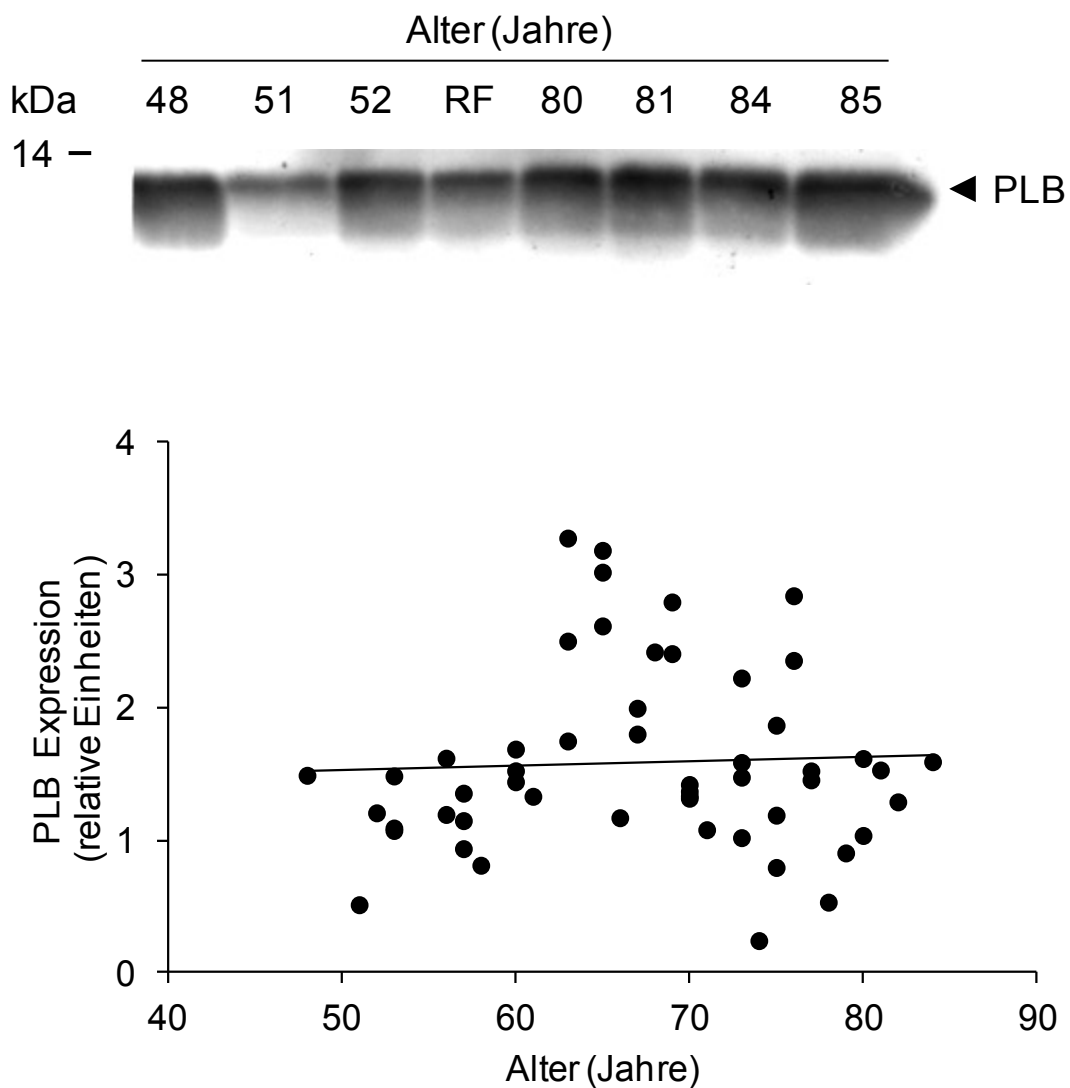
#### 4.2 Analyse der Patientenproben

Im Anschluss an die Validierung der Methoden erfolgte die Analyse der Patientenproben im Western-Blot. Von allen 53 Patienten (Anhang 8.1) wurden die Biopsien der rechten Vorhöfe homogenisiert, der Proteingehalt der Homogenate bestimmt und immer 55 µg Protein pro Spur zusammen mit der Referenzprobe und einem Größenstandard auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen erfolgte der immunologische Nachweis von CSQ2, SERCA2a und PLB. Die Bandenintensitäten wurden erfasst und statistisch ausgewertet. Die **Abbildungen 8** (CSQ2), **9** (PLB) und **10** (SERCA2a) zeigen jeweils einen exemplarischen Western-Blot mit Proben von Patienten unterschiedlichen Alters sowie die gemessene Bandenintensität jedes einzelnen Patienten in Abhängigkeit von seinem Alter (Punktwolke) mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells. Dargestellt ist jeweils die Regressionsgerade. Unter diesen Bedingungen war keine altersabhängige Expression von CSQ2, PLB oder SERCA2a nachweisbar.



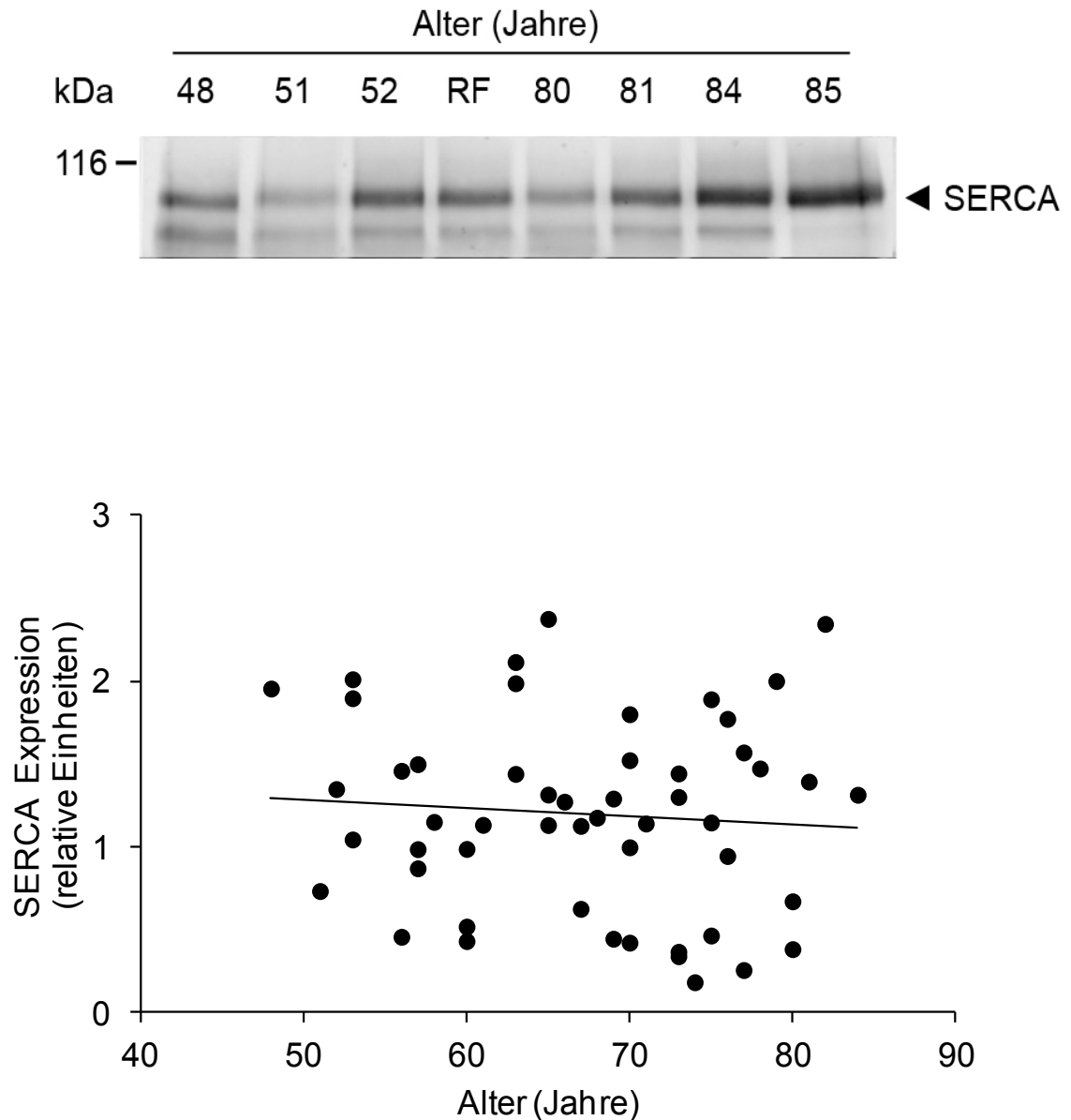
**Abb. 8: Vergleich Proteinexpression von CSQ2 junge versus alte Patienten.**

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters und die Signalintensität von CSQ2 für alle Patienten, sowie das Ergebnis einer linearen Regression.



**Abb. 9: Vergleich Proteinexpression von PLB junge versus alte Patienten**

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters und die Signalintensität von PLB für alle Patienten sowie das Ergebnis einer linearen Regression.



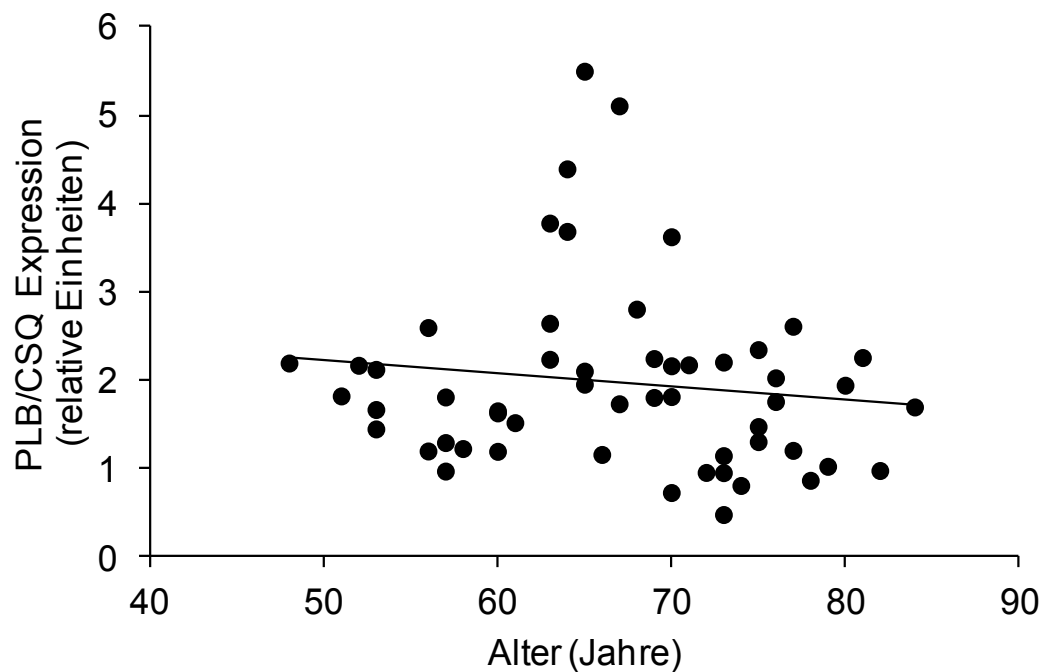
**Abb. 10: Vergleich Proteinexpression von SERCA2a junge versus alte Patienten**

Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot mit Patienten unterschiedlichen Alters und die Signalintensität von SERCA2a für alle Patienten sowie das Ergebnis einer linearen Regression.

Wie schon zuvor erwähnt wird zurzeit angenommen, dass die Expression von CSQ2 streng reguliert wird und keinen krankheitsbedingten oder altersbedingten Schwankungen unterliegt. Die hier präsentierten Daten scheinen dies, abgesehen von wenigen Ausreißern (**Abbildung 8**), zu bestätigen. Daher wurden die Ergebnisse für die PLB- und SERCA2-Expression auch als Quotient mit CSQ2 analysiert. **Abbildung 11** (PLB/CSQ2) und **12** (SERCA2a/CSQ2) zeigen die Ergebnisse jedes einzelnen

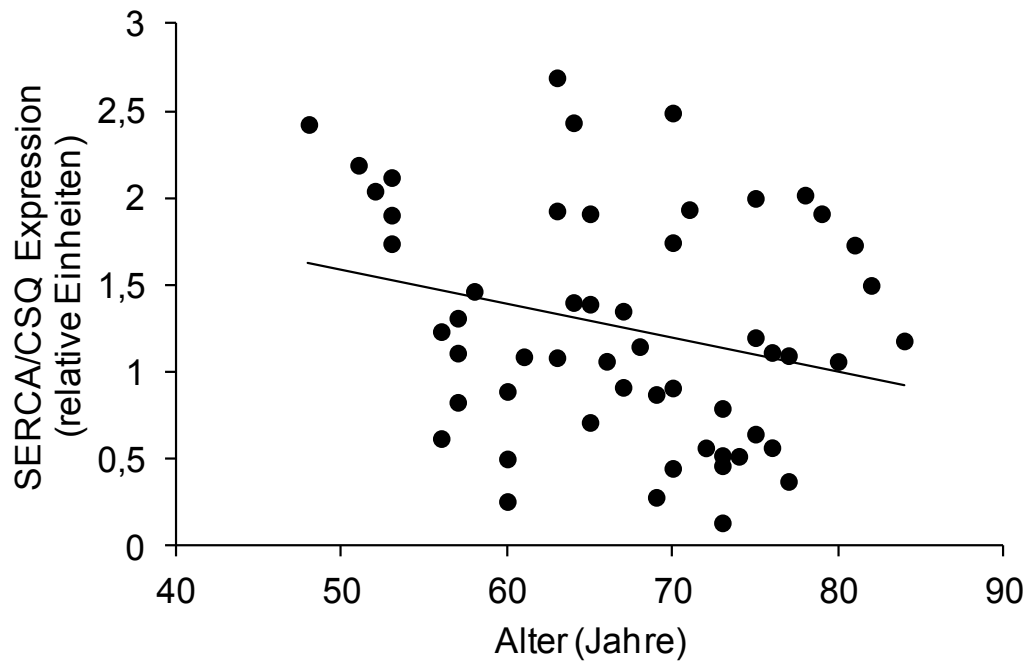


Patienten in Abhängigkeit von seinem Alter (Punktwolke) und die Korrelation der Werte, dargestellt als lineare Regression. Da die PLB- und SERCA2a-Expression mit zunehmendem Alter nicht den gleichen Verlauf zu haben scheint, wurde auch das Verhältnis von SERCA2a zu PLB untersucht. Dies ist insofern von Bedeutung weil dieses Verhältnis entscheidend für die Funktion der SERCA2a ist. **Abbildung 13** zeigt den Quotienten (PLB/SERCA2a) die Ergebnisse jedes einzelnen Patienten in Abhängigkeit von seinem Alter (Punktwolke) und die Korrelation der Werte, dargestellt als lineare Regression. Aber auch unter diesen Bedingungen konnte keine altersabhängige Expression nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ , siehe auch **Tabelle 3**).



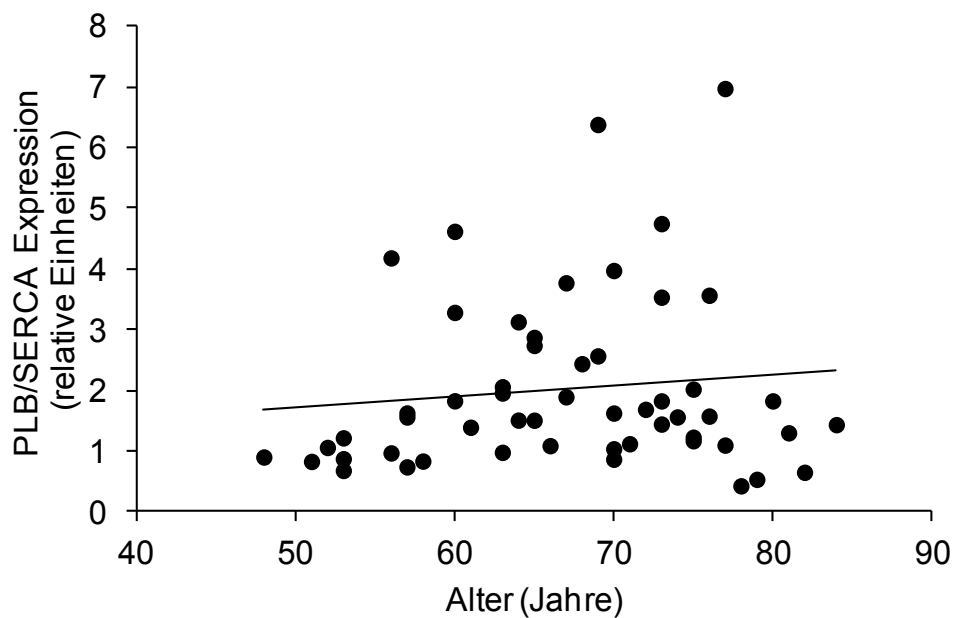
**Abb. 11: Korrelation Proteinexpression Alter vs. PLB/CSQ2**

Die Abbildung zeigt die Expression von PLB normiert auf die CSQ2-Expression in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt sowie das Ergebnis einer linearen Regression.



**Abb. 12: Korrelation Proteinexpression Alter vs. SERCA2a/CSQ2 (Punktwolke)**

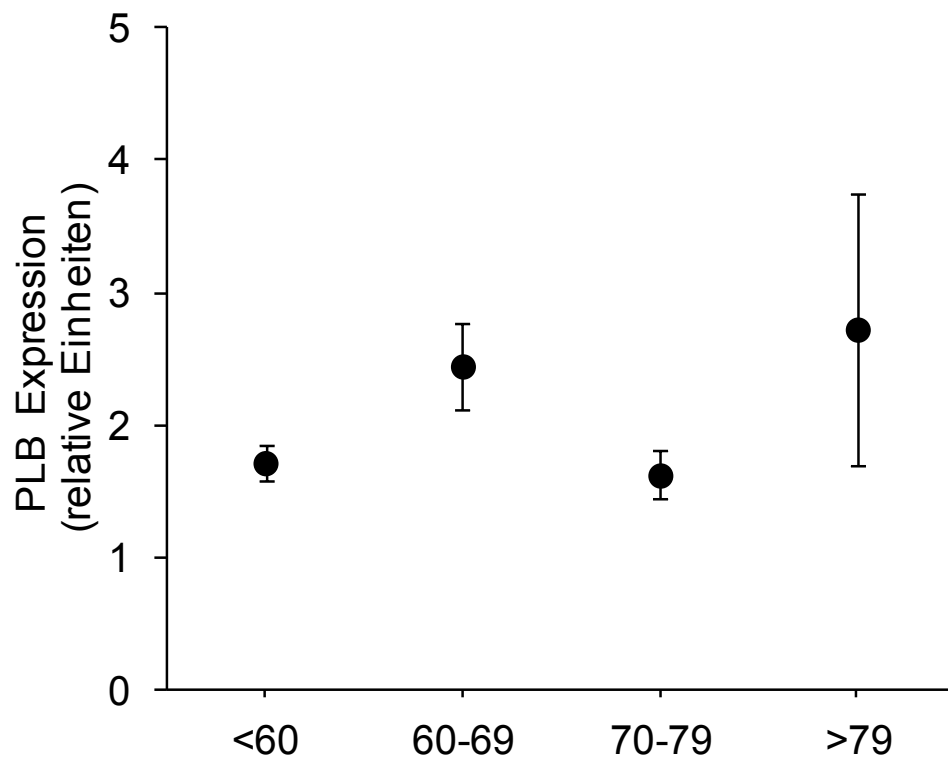
Die Abbildung zeigt die Expression von SERCA2a normiert auf die CSQ2-Expression in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt sowie das Ergebnis einer linearen Regression.

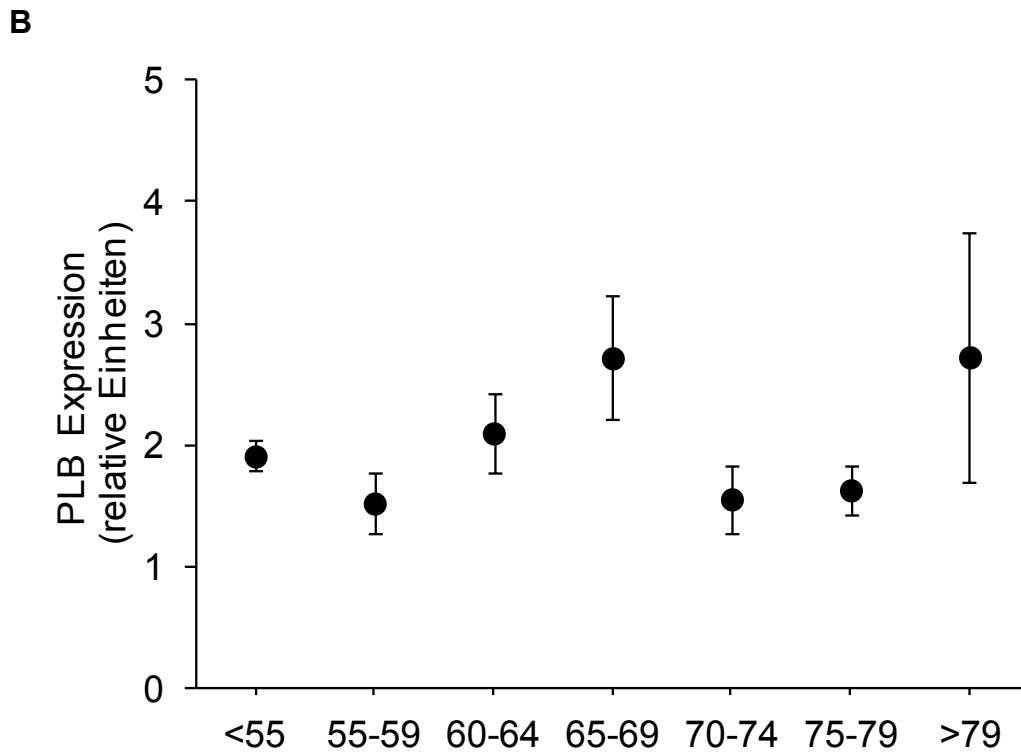


**Abb. 13: Korrelation Proteinexpression Alter vs. PLB/SERCA2a.**

Die Abbildung zeigt die Expression von PLB relativ zur SERCA2a-Expression in Abhängigkeit vom Alter als Punktwolke dargestellt sowie das Ergebnis einer linearen Regression.

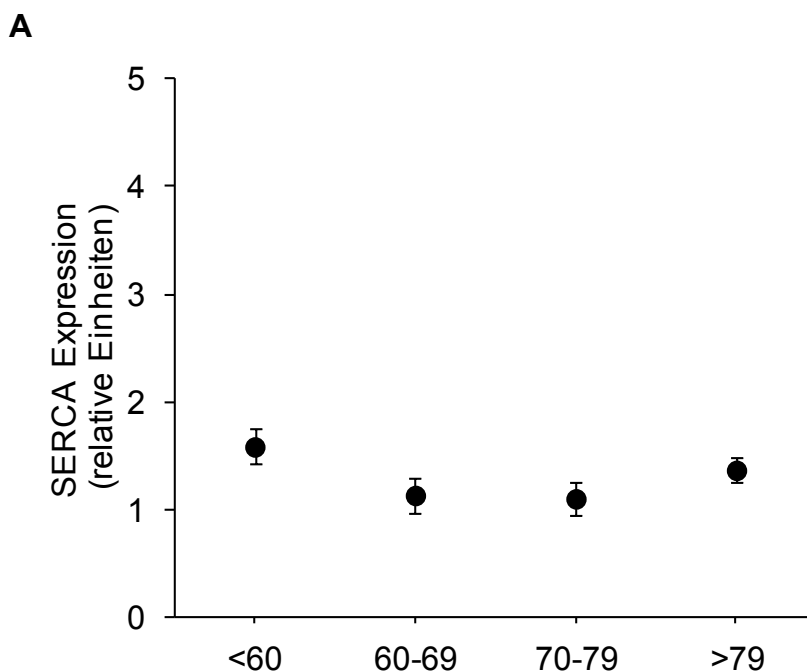
In einem weiteren Analyseansatz wurden die Patienten in Altersgruppen zusammengefasst (10-Jahres- und 5-Jahres-Intervalle). Es wurde die mittlere Expression der untersuchten Proteine in den jeweiligen Gruppen berechnet und die Mittelwerte miteinander verglichen (ANOVA). Für PLB/CSQ2 und SERCA2a/CSQ2 konnte kein Unterschied zwischen den Altersgruppen gefunden werden (**Abbildung 14** und **15**). Wenn das Verhältnis von PLB zu SERCA2a betrachtet wurde, konnte ein Anstieg der Quotienten in den Gruppen 60-69 Jahre bzw. 65-69 Jahre im Vergleich zu der jeweils jüngsten Gruppe gemessen werden ( $p < 0,05$ ; **Abbildung 16**). Dies würde eine Abnahme der SERCA2a-Aktivität bedeuten, die aber mit weiter zunehmendem Alter wieder die Werte der jüngeren Patienten erreicht.

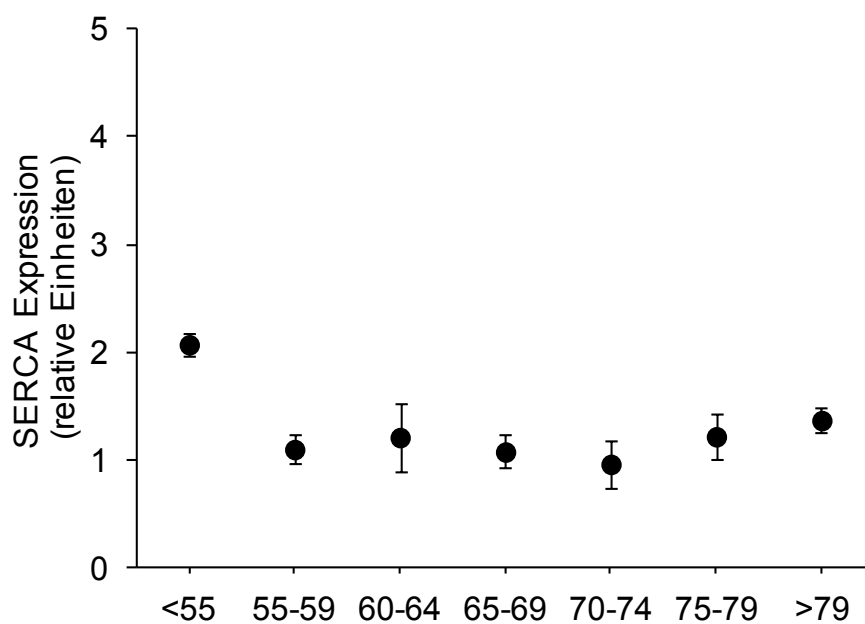
**A**



**Abb. 14: Korrelation Proteinexpression Alter vs. PLB/CSQ2.**

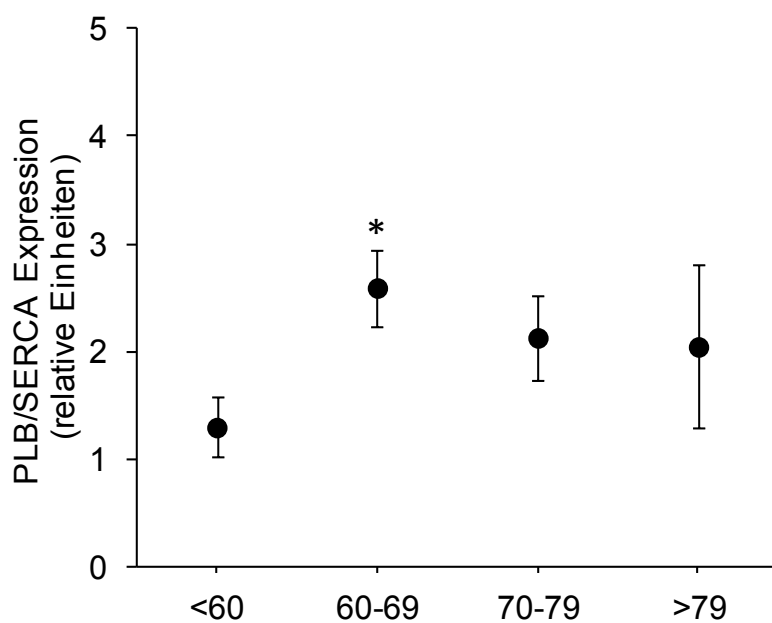
Die Abbildung zeigt die Expression von PLB normiert auf die CSQ2-Expression in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  SEM für **(A)** 10-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <60: n=12; 60-69: n=16; 70-79: n=19; >79: n=5) und **(B)** 5-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <55: n=6; 55-59: n=6; 60-64: n=7; 65-69: n=9; 70-74: n=10; 75-79: n=9; >79: n=5) dargestellt.

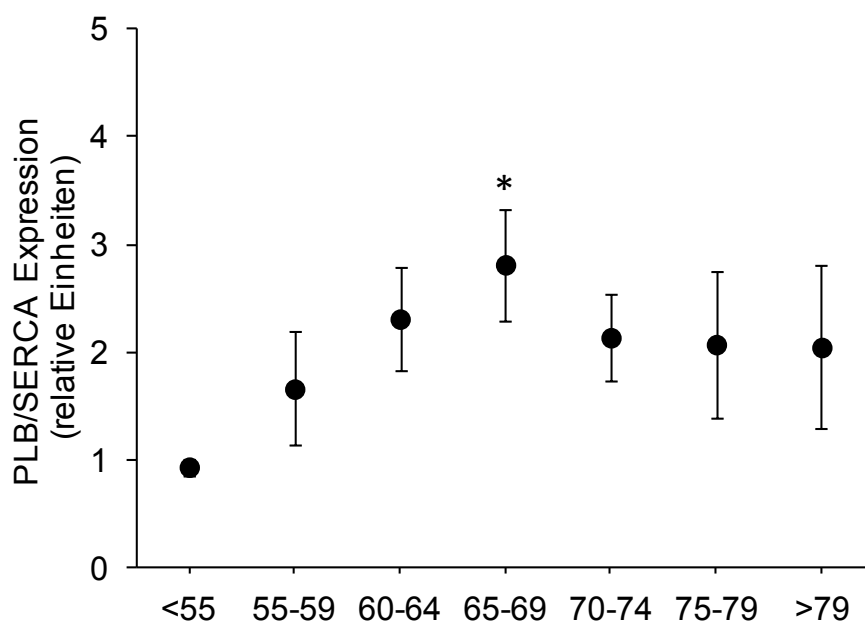


**B**

**Abb. 15: Korrelation Proteinexpression Alter vs. SERCA2a/CSQ2.**

Die Abbildung zeigt die Expression von SERCA2a normiert auf die CSQ2-Expression in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  SEM für (A) 10-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <60: n=12; 60-69: n=16; 70-79: n=19; >79: n=5) und (B) 5-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <55: n=6; 55-59: n=6; 60-64: n=7; 65-69: n=9; 70-74: n=10; 75-79: n=9; >79: n=5) dargestellt.

**A**

**B**

**Abb. 16: Korrelation Proteinexpression Alter vs. PLB/SERCA2a.**

Die Abbildung zeigt die Expression von PLB relativ zur SERCA2a-Expression in Abhängigkeit vom Alter. Sie ist als Fehlerbalkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  SEM für (A) 10-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <60: n=12; 60-69: n=16; 70-79: n=19; >79: n=5) und (B) 5-Jahresaltersgruppen (Gruppengrößen: <55: n=6; 55-59: n=6; 60-64: n=7; 65-69: n=9; 70-74: n=10; 75-79: n=9; >79: n=5) dargestellt. \* $p < 0,05$  vs. jüngste Gruppe (<60 in A und <55 in B)

Mit einer weiteren Datenanalyse wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Leistungsfähigkeit der Herzen, repräsentiert durch die Ejektionsfraktion (EF in %) und der Expression von PLB oder SERCA2a gibt. Hier konnte jedoch kein Zusammenhang gefunden werden (**Tabelle 3**). Ebenfalls wurde kein Zusammenhang zwischen Schweregrad der Erkrankung (CCS-Klassifikation) und Proteinexpression gefunden. Da etwa  $\frac{3}{4}$  der Patienten mit Statinen, ASS und/oder ACE-Hemmer/AT1-Antagonisten therapiert wurden (vgl. Patientendaten, Anhang 8.1), erfolgte auch dafür eine Korrelationsanalyse. Hier konnte nur für ASS-Einnahme und PLB-Expression eine signifikante Beziehung gefunden werden (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** Zusammenfassung der gerechneten Korrelationen (lineares Regressionsmodell:  $\beta$  = standardisierter Regressionskoeffizient). Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind hervorgehoben.

	rel.PLB		rel.SERCA2a		PLB/SERCA2a	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
Alter	0,07	0,360	-0,08	0,341	0,04	0,661
EF	0,05	0,516	-0,12	0,122	-0,02	0,866
CCS	-0,07	0,458	0,02	0,842	-0,14	0,214
Statine	-0,02	0,804	0,05	0,523	0,11	0,277
ASS	<b>-0,19</b>	<b>0,038</b>	0,03	0,743	0,11	0,336
ACE o. AT1	0,10	0,254	-0,01	0,898	-0,04	0,717
rel.PLB	-	-	<b>0,78</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,79</b>	<b>&lt;0,001</b>
rel.SERCA2a	<b>0,81</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	-	<b>-0,89</b>	<b>&lt;0,001</b>
PLB/SERCA2a	<b>0,51</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>-0,55</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	-

ACE, Angiotensin Converting Enzyme (hier für ACE-Hemmer); ASS, Acetyl Salicyl Säure; AT1, Angiotensinrezeptor-Antagonist; CCS, Angina pectoris Klassifikation der Canadian Cardiovascular Society; EF, Ejektionsfraktion; PLB, Phospholamban; SERCA2a, SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase

rel. = auf CSQ2 normierte Expressionen

## **5 Diskussion**

### **5.1 Veränderungen der Expression bei Erkrankungen**

Im Gegensatz zu vielen anderen Publikationen zur Expression der Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums, Calsequestrin, Phospholamban und SERCA2a, die sich auf die Expression der mRNA als Transkriptionsendprodukt dieser Proteine bezogen, wurden in dieser Arbeit die Veränderung der Proteinmenge, die entscheidend für die biologische Wirksamkeit ist, in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Dafür standen, im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Studien nicht Herzkammerngewebe, sondern Gewebeproben vom menschlichen Herzvorhof, gewonnen während Herzbypass- und/oder, mit wenigen Ausnahmen, Herzklappen-Operationen in der Herzchirurgie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg in den Jahren 1997-2008, zur Verfügung. Nach entsprechender Selektion des Untersuchungsgutes, zum Ausschluß führte jegliche Gabe von Schilddrüsenmedikamenten und eine systolische Herzinsuffizienz größer als NYHA 2, konnten 53 Patientenproben untersucht werden. Der Nachweis der zu untersuchenden Proteine erfolgte mit dem Western Blot-Verfahren. Alle drei zu untersuchenden Proteine, Calsequestrin, SERCA2a und Phospholamban, konnten mit diesem Verfahren in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Herzinsuffizienz entsteht, wenn das Herz nicht in der Lage ist, eine angemessene Auswurfmenge entsprechend den metabolischen Bedürfnissen des Organismus zu leisten. Unter physiologischen Bedingungen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR die dominante Quelle der systolischen Aktivierung der kontraktilen Proteine. Mechanische Dysfunktion und Arrhythmien sind typische Merkmale der Herzinsuffizienz, der gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel eine wesentliche Ursache für diese zwei charakteristischen Veränderungen. Tatsächlich gibt es Fakten, die für eine Abnahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und verminderten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt sprechen, als wesentliche Ursache veränderter Kontraktilität bei Herzinsuffizienz (O'Rourke et al., 1999, Piacentino et al., 2003), die darauf zurückzuführen sind, dass ursächliche Veränderungen in der Expression und Aktivität von verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteinen vorkommen, vor allem eine Abnahme der SERCA2a- und eine Zunahme der NCX-Expression, beschrieben an unterschiedlichen Herzinsuffizienz-Modellen bei Tieren und Menschen (Hasenfuss, 1998). Der Vergleich der vorliegenden Studien bezüglich einer eindeutigen Antwort, ob sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteine in Abhängigkeit vom Schweregrad der Herzinsuffizienz verändern, ob es zu einer Zunahme oder Abnahme kommt, ist schwierig zu interpretieren. Letztlich sind fünf Variablen maßgeblich, erstens die unterschiedliche Pathophysiologie zwischen verschiedenen Herzinsuffizienzmodellen,



zweitens die Ebene der molekularen Untersuchung, somit die Nichtvergleichbarkeit der mRNA Expression mit der wirksamen Proteinmenge, da sowohl Bindungsfähigkeit als auch Menge verändert sein können. Drittens der Zeitpunkt der Messung, und somit die Altersabhängigkeit der Tiermodelle. Die vierte Variable bezieht sich auf die Art der Präparation, ob Homogenate oder teilweise gereinigte Membran-Präparate verwendet wurden und als fünfte Variable spielt bei Studien der menschlichen Herzinsuffizienz die Ätiologie, Schwere und Verlauf, Begleiterkrankungen und medikamentöse Therapie eine entscheidende Rolle (Hasenfuss, 1998).

Bekannte Veränderungen der Genexpression der Proteine der Plasmamembran, der kontraktilen Proteine und der Proteine des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels im SR bei menschlicher Herzinsuffizienz sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Änderungen in der Genexpression von insuffizienten Kardiomyozyten

Protein	Veränderung bei menschlicher Herzinsuffizienz
<b>Plasmamembran</b>	
L-Typ Kanäle	Vermindert <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
NCX	Ver mehrt <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
$\text{Na}^+$ - Pumpe	Reexpression von fötalen Isoformen
$\beta_1$ -Adrenorezeptor	Vermindert <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
$\beta_2$ -Adrenorezeptor	Ver mehrt <sup>*</sup>
$\alpha_1$ -Adrenorezeptor	Ver mehrt <sup>*</sup>
<b>Kontraktile Proteine</b>	
Myosin – schwere Kette	Umkehr zur fötalen Isoform
Myosin – leichte Kette	Umkehr zur fötalen Isoform
Actin	Normal <sup>*</sup>
Titin	Isoform wechselt ( $\uparrow$ N2BA:N2B), hypophosphoryliert
Troponin I	Normal <sup>*</sup>
Troponin T	Umkehr zur fötalen Isoform
Troponin C	Normal <sup>*</sup>
Tropomyosin	Normal <sup>*</sup>
<b>Sarkoplasmatisches Retikulum</b>	
SERCA2a	Normal oder vermindert <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
Phospholamban	Vermindert <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
Ryanodin -Rezeptor	hyperphosphoryliert <sup>+</sup>
Calsequestrin	Normal <sup>*</sup>
Calreticulin	Normal <sup>*</sup>

\* Bezogen auf die Proteinmenge

+ Bezogen auf die funktionelle Aktivität (nach:(Hasenfuss et al., 2014))

## 5.2 Altersabhängigkeit Calsequestrin

Die Calsequestrin-Expression zeigt sich unverändert während der ontogenetischen Entwicklung und Alterung, sowohl im hypertrophen Myokard durch Drucküberlastung, als auch bei Hyper- oder Hypothyreose. Eine statistisch signifikante Änderung der Expression von Calsequestrin im Vorhofgewebe in Abhängigkeit von Alter konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden, übereinstimmend zu anderen bisher durchgeführten Studien am insuffizienten menschlichen Myokard, die durchweg unveränderte mRNA und Proteinmengen im Vergleich zum nichtinsuffizienten Myokard zeigten.

Calsequestrin (CSQ2) ist das wichtigste Protein im SR-Lumen, einerseits als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und andererseits für die Teilnahme an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch die Interaktion mit dem Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2).  $\text{Ca}^{2+}$ , gespeichert durch Calsequestrin, wird für den Freisetzungsprozess durch die Calsequestrin-Calcium-Entladung in die innere Öffnung des Calciumfreisetzungskanals verfügbar. Dieser Prozess ersetzt jene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die aus der äußeren Öffnung in das Zytosol freigesetzt wurden. Hypothetisch können Calsequestrin und zwei andere, die in der SR-Membran lokalisierten Proteine Junctin und Triadin, an der Regulation der Eigenschaften des Ryanodinrezeptors beteiligt sein (Opie et al., 2014).

Eine Veränderung der normalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase trägt wesentlich zu der, bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz beobachteten kontraktile Dysfunktion bei (Ai et al., 2005). Das hochgeladene Speicherprotein findet sich in einem Teil des SR in der Nähe der T-Tubuli.

## 5.3 Altersabhängigkeit SERCA2a

SERCA-mRNA ist bei Herzinsuffizienz herunterreguliert. Kontrovers wird in verschiedenen Studien diskutiert, ob es zu einer Verringerung der exprimierten Proteinmenge kommt. Jedoch wird die Funktion von SERCA2a durchweg verringert, vielleicht aufgrund der geänderten Relation von PLB zu SERCA2a. Für Studien am alternden Rattenherzen und menschlichen Herzen wurde über eine Verringerung der SERCA-mRNA Expressionsmengen berichtet. Jedoch sind Daten bezüglich der Proteinmengen unseres Wissens nicht bekannt.

Eine signifikante Verminderung der SERCA2a-Proteinmenge in Abhängigkeit vom Alter ließ sich in dieser Arbeit nicht nachweisen. Es ist denkbar, dass letztlich in den untersuchten Vorhofproben (die mehr SERCA2a als die Herzkammern enthalten), SERCA2a-Mengen nur schwach beeinflusst werden.

Vornehmlich gab es keine Tendenz in Richtung zu einer positiven oder negativen Wechselbeziehung zwischen Alter und SERCA2a-Expression. Keine Wechselbeziehung mit dem Alter gewann an Bedeutung. Zwischen SR-Proteinen gab es erwartungsgemäß eine starke positive Korrelation zwischen PLB- und SERCA2a-Expression. Die Abnahme der SERCA2a Expression ist nicht parallel mit einem Rückgang von PLB verknüpft, das würde zu einem Anstieg der funktionalen Stöchiometrie PLB/SERCA2a, mit einem Rückgang der SERCA2a  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmerate und zu einer Verlängerung der Relaxationszeiten führen (Meyer et al., 1995).

Aufgrund dieser zentralen Rolle von SERCA2a und PLB im  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling, scheinen Veränderungen der SERCA2a- und/oder PLB-Mengen oder deren Aktivität, zum Wiederherstellen der gestörten  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme in das SR, als potentielle therapeutische Strategien für die Herzinsuffizienz-Behandlung prospektiv vielversprechend zu sein (del Monte et al., 2003). Eine Überexpression von SERCA2a konnte das  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling und die kontraktile Funktion sowohl im Tiermodell (Cutler et al., 2012), als auch bei menschlicher Herzinsuffizienz (del Monte et al., 1999, Jaski et al., 2009) wiederherstellen, was darauf hindeutet, dass die Reparatur der SERCA2a Expression eine sinnvolle Therapie sein kann.

Die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das Myokard des Patienten ist im Endstadium einer Herzinsuffizienz eingeschränkt. Die Expression von SERCA2a, die für die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Kardiomyozyten verantwortlich ist, wird auf Transkriptionsebene und der Proteinebene verringert und scheint somit eine kausale Rolle bei der Regulierung der Herzfunktion beim insuffizienten und nicht insuffizienten Myokard zu spielen. Die Bedeutung der SERCA2a im  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel und in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz hat sich auch in Versuchen bei SERCA2a Knockout(KO)-Mäusen mit einer 35%igen Reduktion der Proteinexpression zeigen lassen. Die Herzfunktionen war beeinträchtigt, ohne stärkere Zeichen der Herzinsuffizienz in Ruhe. Unter Druckbelastung zeigten SERCA2a heterozygote Mäuse sichtbare Herzinsuffizienzzeichen mit erhöhter Mortalität und Morbidität.

SERCA2a Expression und Aktivität sind bei den häufig vorkommenden Herzkrankheiten, wie der koronaren Herzkrankheit, Herzmuskelerkrankungen und Herzinsuffizienz verändert. Zur Wiederherstellung einer adäquaten SERCA2a Expression, wurde die Gentherapie als neuer Ansatz für die Behandlung der Herzinsuffizienz entwickelt. (Shan et al., 2010).

Eine Adeno - Virus assoziierte (AAV) Aufnahme von SERCA2a scheint eine sichere und wirksame Therapie für die Behandlung der Herzinsuffizienz zu sein. Das konnten klinische Studien in Phase 1 und 2 nachweisen. Derzeit wird in klinischen Phase 3

Studien zum Gentransfer von SERCA2a, die Wirksamkeit mittels einzelner intrakoronarer Infusionen mit einer größeren Anzahl von Patienten (ca. 400) untersucht (Park et al., 2013).

#### 5.4 Altersabhängigkeit Phospholamban

Bei Herzinsuffizienz gibt es dürftige Hinweise für PLB-Herunterregulation in der Literatur. Während von einer Verringerung der mRNA-Expression normalerweise berichtet wird, wurde von der PLB-Expression in den meisten Studien gezeigt, nicht verändert zu sein.

Bei dieser Untersuchung konnte keine signifikante Veränderung der Phospholamban-Expression in Abhängigkeit vom Alter nachgewiesen werden.

In den vergangenen Jahren wurde ein doppelter Effekt der CaMKII-abhängigen Protein-Phosphorylation (positiv und negativ) bei Versuchen zu Ischämie und Reperfusion am intakten Herzen beschrieben. Die vorteilhafte Wirkung von CaMKII bezieht sich in der Regel auf das intrazelluläre  $Ca^{2+}$  und kontraktile Wiederherstellung während des Stunnings, im Sinne einer vollständig reversiblen postischämischen Dysfunktion (Braunwald et al., 1982). Ursprünglich wurde dieser positive Effekt in Verbindung mit einer erhöhten Phosphorylierung der Threonin-17 Orte im PLB zu Beginn der Reperfusion interpretiert (Vittone et al., 2002).

Eine erweitertes SR  $Ca^{2+}$ -Leck, durch hyperphosphoryliertes RYR2 würde auch zum Rückgang des SR  $Ca^{2+}$ -Gehalts und der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung beitragen, wie es typisch für Herzinsuffizienz ist (Ai et al., 2005, Shan et al., 2010, Respress et al., 2012).

Darüber hinaus wurde eine Verringerung der Phosphorylierung von PLB festgestellt und zwar entweder an Serin-16 (Schwinger et al., 1999, Sande et al., 2002), oder an Threonin-17 (Netticadan et al., 2000) oder beiden (Huang et al., 1999, Mishra et al., 2003), was für eine erhöhte Hemmung der SERCA2a spricht. Das kann auf die Dämpfung der  $\beta$ 1-adrenergen Kaskade zurückzuführen sein, durch Rezeptor-Desensibilisierung, Herunterregulation und Abkoppelung, die typisch ist für die Progression der Krankheit (Bristow et al., 1982, Dash et al., 2001, Port et al., 2001), und/oder auf die Erhöhung der PP1-Aktivität. Im menschlichen insuffizienten Myokard vermindert sich die Phosphorylierung von Serin-16 in PLB, aufgrund des Anstieg der PP1-Aktivität (Schwinger et al., 1999), während sich die Threonin-17-Phosphorylierung aufgrund der erhöhten Aktivität der PP2B verringerte (Calcineurin;(Munch et al., 2002)). Interessanterweise ist dieser Rückgang, trotz einer Erhöhung der CaMKII Aktivität, charakteristisch für Herzinsuffizienz. Zusammen genommen, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Erhöhung des SERCA2a/PLB -Verhältnisses und die

verminderte Phosphorylierung von PLB, wichtige Faktoren bei der Untersuchung der verminderten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei Herzinsuffizienz sind, wodurch es zu einem Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ , einer Abnahme der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und somit des zur Verfügung stehenden  $\text{Ca}^{2+}$  für die Kontraktion kommt. Dies führt zu einer geringeren kontraktilen Kraft, die Relaxation ist beeinträchtigt und die Kraft-Frequenz-Beziehung ist verändert.

Außerdem verhindert die PLB-Ablation Herzinsuffizienz in einem Maus-Modell bei dilatativer Kardiomyopathie, verursacht durch Mangel an muskelspezifischem LIM-Protein (Arber et al., 1997, Minamisawa et al., 1999). In isolierten menschlichen Myocyten von insuffizienten Herzen, verbesserte eine Gentherapie mit Unempfindlichkeit gegen PLB, die kontraktile und diastolische Funktion (del Monte et al., 2002). Im Gegensatz dazu, erhöht die PLB-Ablation die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Ladung und Kontraktilität bei Mäusen mit Kardiomyopathie, zurückzuführen auf eine Überexpression von CaMKII. Dies führte zu vorzeitigem Tod und mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, was darauf hindeutet, dass eine Beschleunigung SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und zunehmende SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung nachteilig, zumindest in Gegenwart von übermäßiger CaMKII-Aktivität, ist (Zhang et al., 2010). Im Angesicht der phosphorylierten RyR2-Kanäle, wie im Fall der CaMKII überexprimierenden Mäuse, könnte es, durch die Wiederauffüllung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern durch PLB-Ablation, zu einer weiteren Verschlechterung der Herzfunktion durch mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ladung, Zelltod und Arrhythmien kommen (Mattiuzzi et al., 2014). Studien haben gezeigt, dass die Mutation des menschlichen Phospholambans zu einer dilatativen Kardiomyopathie führt. Andererseits führt die chronische Hemmung der SERCA2a durch Phospholamban zu vorzeitigem kardialen Todesfällen in Familien, die diese Mutation in sich tragen. Bei Herzinsuffizienz ist der Spiegel von Phospholamban unbeeinflusst, aber die Phospholamban-Phosphorylation ist geringer, was zu einer verminderten SERCA2a Aktivität führt. Die verminderte Phosphorylation von Phospholamban am insuffizienten Herzen ist hauptsächlich verursacht durch die ansteigende Proteinphosphatase 1-Aktivität. Deshalb könnte die Hemmung der Proteinphosphatase 1 vermittelten Dephosphorylation von Phospholamban eine Strategie sein, die SERCA2a-Aktivität bei Herzinsuffizienz wieder herzustellen. Eine Beschränkung dieses Ansatzes kommt zustande, da die Proteinphosphatase 1 in verschiedene biologische Prozesse, in verschiedenen Organen, involviert ist. Daher müsste eine spezifische gezielte Hemmung der Proteinphosphatase 1 speziell am Herzen möglich sein. (Park et al., 2013).

## 5.5 Einfluss der Medikamenteneinnahme

Eine gravierende Beschränkung der vorliegenden Studie war, dass alle Patienten morbiditätsbedingt Medikamente erhielten und wir nicht ausschließen konnten, dass einige der Veränderungen, die im alternden Vorhofmyokard vorhanden sind, durch Medikamentenwirkungen verdeckt wurden. Allerdings bestand eine klinische Notwendigkeit, die Patienten medikamentös zu behandeln. Ein Absetzen der Medikamente über einen längeren Zeitraum vor dem interventionellen Eingriff und Probengewinnung wäre ethisch nicht vertretbar gewesen.

Letztlich schlossen wir nur Patienten ein, die außer ASS, AT1-Rezeptorantagonisten oder ACE-Hemmer, CSE-Hemmer und  $\beta$ -Adrenorezeptorenblocker, und hier speziell nur bei Gabe von Metoprolol, Bisoprolol und Carvedilol, keine weiteren kardial wirksamen Medikamente einnahmen, um diese als Störvariablen auszuschließen. Die Behandlungsleitlinien zur medikamentösen Therapie der koronaren Herzkrankheit entsprachen zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei mehr als 70% der eingeschlossenen Patienten im wesentlichen der Nationalen Versorgungsleitlinie „Chronische KHK“ der Bundesärztekammer (Donner-Banzhoff et al.). Darüber hinaus schlossen wir schwer kranke Patienten aus (NYHA IV), da erwartet wurde, dass sie unsere Ergebnisse beeinflussen, da viele Genveränderungen im Endstadium der Herzinsuffizienz bekannt sind (Hasenfuss et al., 2014). Ebenfalls schlossen wir Patienten aus, die mit Schilddrüsenhormonen oder Thyreostatika behandelt wurden, da für diese Substanzen eine Beeinflussung der mRNA-Expression von SERCA2a und Phospholamban bekannt ist. Für Calsequestrin scheint es keine Beeinflussung zu geben (Arai et al., 1991).

Tatsächlich waren in verschiedenen Korrelationen Medikamentenwirkungen (z.B. ASS) in den Proben sichtbar, die hier untersucht wurden. Für ASS ( $p < 0,038$ ) bestand in den untersuchten Vorhofproben eine geringe signifikante negative Korrelation zu Phospholamban. Es lässt sich vermuten, dass Acetylsalicylsäure nicht nur entzündungshemmend und irreversibel hemmend auf die Funktion der Thrombozyten wirkt, sondern möglicherweise auch eine weitere, bisher nicht untersuchte, systemische Wirkung im Sinne einer Blockierung der Phospholambanwirkung hat und somit zu einer besseren  $Ca^{2+}$ -Aufnahme durch SERCA2a führt.

Weder für die Medikation mit AT1-Rezeptorantagonisten oder ACE-Hemmern, CSE-Hemmer noch  $\beta$ -Adrenorezeptorenblocker, ließen sich Korrelationen zur Expression der untersuchten Proteine herstellen.

Ein Nachteil der vorliegenden Arbeit kann in der Tatsache gesehen werden, dass nur krankes Vorhofmyokard untersucht werden konnte. Außerdem sind wir, wegen des

Mangels an Gewebe, nicht in der Lage gewesen, Kammergewebe zu untersuchen. Ebenso konnten keine Aussagen darüber getroffen werden, wie die Expressionsmengen der untersuchten Proteine in der Kindheit oder bei jungen Erwachsenen sind, da verständlicherweise keine Gewebeproben dieser Altersklassen entnommen werden konnten.

Spätere Studien über den gesamten Altersbereich von Menschen könnten die möglicherweise versteckten Veränderungen aufdecken, die über viele Jahrzehnte entstehen und wären möglicherweise hilfreich, viel größere Änderungen in der Proteinexpression zu entdecken. Tatsächlich waren die invasiv ventrikulographisch gemessenen Ejektionsfraktionen im Normbereich, was für das Fehlen einer systolischen Herzschwäche bei den Studienpatienten sprach. Schließlich gab es eine große Streuung in den Daten, wesentlich mehr, als man mit den gleichen biochemischen Methoden am alternden Tierherz beobachten würde. Jedoch kann diese Streuung einfach bedeuten, dass das kardiale Altern viele, bis jetzt nicht entdeckte Variablen zur Folge hat.



## **6 Zusammenfassung**

Die Herzmuskulatur verfügt über ein komplexes System von Proteinen, die für die Bereitstellung und Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Muskelkontraktion und Relaxation erforderlich sind. Einige dieser Proteine sind, wie Calsequestrin 2, Phospholamban und SERCA2a, im SR selbst lokalisiert.

Störungen in der Speicherung und in der Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  infolge verminderter Expression, sowie Störungen in der Funktion durch genetische Veränderungen führen, sowohl im Tiermodell als auch am menschlichen Herz, zu Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen.

Zielstellung dieser Arbeit war der Nachweis altersbedingter Veränderungen der Proteinexpression von Calsequestrin 2, Phospholamban und SERCA2a aus intraoperativ gewonnenen Gewebeproben des menschlichen Vorhofs männlicher Patienten ( $n = 53$ ) mit dem Western Blot-Verfahren. Einschlusskriterien waren eine  $\beta$ -Blocker Einnahme, ein NYHA Stadium  $\leq$  III und möglichst wenige weitere eingenommene Medikamente. Zum Ausschluss führte die Einnahme von Schilddrüsenhormonen oder Thyreostatika.

Für keines der untersuchten Proteine ließ sich eine statistisch signifikante Altersabhängigkeit nachweisen. Es wurden sehr unterschiedliche Expressionsniveaus beobachtet, so dass zu vermuten ist, dass starke interindividuelle Schwankungen auch innerhalb derselben Altersgruppen bestehen. Zwischen den Proteinen bestand allerdings eine starke signifikante Korrelation, was auch aufgrund der gegenseitigen Abhängigkeit im Calciumhaushalt zu erwarten war.

Bis auf die Einnahme von Acetylsalicylsäure, mit einer signifikanten negativen Korrelation für Phospholamban, zeigte sich statistisch keine Beeinflussung dieser Proteine durch Medikamente. Das könnte ein Hinweis auf eine molekulare Wirkung von Acetylsalicylsäure, mit Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bereitstellung durch Hemmung der Phospholamban-Expression, auf die Herzmuskelkontraktion sein. Ob sich aus größeren Probenzahlen, eventueller Untersuchung von gesundem Ventrikelmyokard, andere Ergebnisse im Hinblick auf die altersabhängige Expression dieser Proteine ergeben, bleibt abzuwarten.

Eine gezielte medikamentöse Beeinflussung der Expression von Phospholamban und SERCA2a, und somit eine Beeinflussung des Calciumstoffwechsels, könnte ein wirkungsvoller Ansatz für die Behandlung der Herzinsuffizienz sein, der derzeit in mehreren klinischen Studien geprüft wird.

## **7 Literaturverzeichnis**

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res* 97: 1314-1322

Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1991) Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res* 69: 266-276

Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 88: 393-403

Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwat A, Hoit B, Walsh R, Marban E, Periasamy M (1998) Targeted Overexpression of the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Increases Cardiac Contractility in Transgenic Mouse Hearts. *Circ Res* 83: 1205-1214

Bers DM (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res* 87: 275-281

Bers DM (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* 37: 417-429

Bers DM, Bassani JW, Bassani RA (1996) Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N Y Acad Sci* 779: 430-442

Braunwald E, Kloner RA (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66: 1146-1149

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211

Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO, Mintzer MC (1983) Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein. *J Biol Chem* 258: 1197-1204

Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Etensohn K, Pfeifer K, Akin B, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2007) Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak independent of luminal Ca<sup>2+</sup> and trigger ventricular arrhythmias in mice. *Circ Res* 101: 617-626

Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG (2000) A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta-agonists *J Biol Chem* 275: 38938-38943

Cutler MJ, Wan X, Plummer BN, Liu H, Deschenes I, Laurita KR, Hajjar RJ, Rosenbaum DS (2012) Targeted sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2a gene delivery to restore electrical stability in the failing heart. *Circulation* 126: 2095-2104

Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Liggett SB, Lorenz JN, Dorn GW, 2nd, Kranias EG (2001) Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation* 103: 889-896

del Monte F, Hajjar RJ (2003) Targeting calcium cycling proteins in heart failure through gene transfer. *J Physiol* 546: 49-61

del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ (2002) Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation* 105: 904-907

del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ (1999) Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100: 2308-2311

Donner-Banzhoff N, Held K, Laufs U, Trappe HJ, Werdan K, Zerkowski HR Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK. Berlin-Düsseldorf: BÄK, AWMF, KBV. Kurzfassung, 1.Auflage. 2006 Version 1: 36-39

Edes I, Talosi L, Kranias EG (1991) The effect of alpha-adrenergic agents and protein kinase C activators on protein phosphorylation in isolated guinea pig hearts. *Eur Heart J* 12 Suppl F: 143-144

Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249: 469-495

Faggioni M, Knollmann BC (2012) Calsequestrin 2 and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1250-H1260

Frank KF, Bolck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RH (2002) Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: I72-78

Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RH (2003) Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 57: 20-27

Franzini-Armstrong C, Kenney LJ, Varriano-Marston E (1987) The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol* 105: 49-56

Guo W, Jorgensen AO, Jones LR, Campbell KP (1996) Biochemical Characterization and Molecular Cloning of Cardiac Triadin. *J Biol Chem* 271: 458-465

Hasenfuss G (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 37: 279-289

Hasenfuss G, Mann DL: Pathophysiology of Heart failure. In: Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P (eds.) *Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 10th edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014, pp. 454-465

Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N (1999) Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res* 85: 848-855

Huggins JP, Cook EA, Piggott JR, Mattinsley TJ, England PJ (1989) Phospholamban is a good substrate for cyclic GMP-dependent protein kinase in vitro, but not in intact cardiac or smooth muscle. *Biochem J* 260: 829-835

Hulot JS, Senyei G, Hajjar RJ (2012) Sarcoplasmic reticulum and calcium cycling targeting by gene therapy. *Gene Ther* 19: 596-599

Hummel A, Empen K, Dorr M, Felix SB (2014) Diagnosis of systolic and diastolic heart failure. *Der Internist* 55: 647-654

Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, Borow K, Dittrich H, Zsebo KM, Hajjar RJ (2009) Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* 15: 171-181

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

Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi M, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Cleemann L, Morad M (1998) Regulation of Ca<sup>2+</sup> - signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 101: 1385-1393

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30787-30796

Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, 2nd, Walsh RA, Kranias EG (1996) Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J Clin Invest* 97: 533-539

Kim E, Youn B, Kemper L, Campbell C, Milting H, Varsanyi M, Kang C (2007) Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* 373: 1047-1057

Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, Knollmann BE, Horton KD, Weissman NJ, Holinstat I, Zhang W, Roden DM, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Pfeifer K (2006) Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 116: 2510-2520

Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BE, Weissman NJ, Jones LR, Morad M (2000) Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol* 525: 483-498

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M (2001) A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 69: 1378-1384

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983) beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258: 464-471

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994) Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75: 401-409

MacLennan DH, Wong PT (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 1231-1235

Mattiazzi A, Kranias EG (2014) The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol* 5: 5

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33: 1794

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G, et al. (1995) Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92: 778-784

Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J, Jr., Kranias EG, Giles WR, Chien KR (1999) Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 99: 313-322

Mishra S, Sabbah HN, Jain JC, Gupta RC (2003) Reduced Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase activity and expression in LV myocardium of dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H876-883

Movsesian MA, Nishikawa M, Adelstein RS (1984) Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J Biol Chem* 259: 8029-8032



Munch G, Bolck B, Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RH (1998) Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. *J Mol Med (Berl)* 76: 434-441

Munch G, Bolck B, Karczewski P, Schwinger RH (2002) Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34: 321-334

Netticadan T, Temsah RM, Kawabata K, Dhalla NS (2000) Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res* 86: 596-605

O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E (1999) Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res* 84: 562-570

Opie LH, Bers DM: Mechanism of Cardiac Contraction und Relaxation. In: Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P (eds.) Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. 10th edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014, pp. 435-440

Orchard CH, Houser SR, Kort AA, Bahinski A, Capogrossi MC, Lakatta EG (1987) Acidosis facilitates spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rat myocardium. *J Gen Physiol* 90: 145-165

Park WJ, Oh JG (2013) SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure. *BMB Rep* 46: 237-243

Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY (1982) Effects of pH on Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res* 50: 287-293

Piacentino V, 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR (2003) Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 92: 651-658

Port JD, Bristow MR (2001) Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33: 887-905

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490: 27-34

Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P (2002) Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91: e21-e26

Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit SS, deAlmeida A, Voigt N, Lawrence WS, Skapura DG, Skardal K, Wisloff U, Wieland T, Ai X, Pogwizd SM, Dobrev D, Wehrens XH (2012) Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res* 110: 1474-1483

Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Dedman JR, Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A (2008) Increased intracellular Ca<sup>2+</sup> and SR Ca<sup>2+</sup> load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1669-1683

Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G (2002) Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res* 53: 382-391

Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn IG, Kadambi VJ, Yatani A (1998) Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 273: 28470-28477

Schmidt AG, Kadambi VJ, Ball N, Sato Y, Walsh RA, Kranias EG, Hoit BD (2000) Cardiac-specific overexpression of calsequestrin results in left ventricular hypertrophy, depressed force-frequency relation and pulsus alternans in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1735-1744

Schultz JEJ, Glascock BJ, Witt SA, Nieman ML, Nattamai KJ, Liu LH, Lorenz JN, Shull GE, Kimball TR, Periasamy M (2004) Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1146-1153

Schwartz JB, Zipes DP: Cardiovascular Disease in the Elderly. In: Bonow R, Mann DL, Zipes DP, Libby P (eds.) *Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 10th edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014, pp. 1711-1713

Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E (1999) Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 31: 479-491

Scott BT, Simmerman HK, Collins JH, Nadal-Ginard B, Jones LR (1988) Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* 263: 8958-8964

Scriven DRL, Dan P, Moore EDW (2000) Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophys J* 79: 2682-2691

Sham JS, Cleemann L, Morad M (1995) Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 121-125

Shan J, Betzenhauser MJ, Kushnir A, Reiken S, Meli AC, Wronska A, Dura M, Chen BX, Marks AR (2010) Role of chronic ryanodine receptor phosphorylation in heart failure and beta-adrenergic receptor blockade in mice. *J Clin Invest* 120: 4375-4387

Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR (1986) Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* 261: 13333-13341

Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947

Tiller D, Russ M, Greiser KH, Nuding S, Ebelt H, Kluttig A, Kors JA, Thiery J, Bruegel M, Haerting J, Werdan K (2013) Prevalence of symptomatic heart failure with reduced and with normal ejection fraction in an elderly general population-the CARLA study. *PLoS One* 8: e59225

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354

Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D, Kranias EG (2013) Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation. *PLoS One* 8: e80867

Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Gyorke I, Terentyeva R, Volpe P, Priori SG, Napolitano C, Nori A, Williams SC, Gyorke S (2004) Abnormal calcium signaling and sudden cardiac death associated with mutation of calsequestrin. *Circ Res* 94: 471-477

Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A (2002) Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol* 34: 39-50

Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR (1989) Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 264: 11468-11474

Young HS, Stokes DL (2004) The mechanics of calcium transport. *J Membr Biol* 198: 55-63

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272: 23389-23397

Zhang T, Guo T, Mishra S, Dalton ND, Kranias EG, Peterson KL, Bers DM, Brown JH (2010) Phospholamban ablation rescues sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling but exacerbates cardiac dysfunction in CaMKII $\delta$ (C) transgenic mice. *Circ Res* 106: 354-362

## 8 Anhang

### 8.1 Patientendaten

**Tabelle 5:** Auflistung aller eingeschlossenen Patienten.

ACE/AT1: "Angiotensin Converting Enzyme"-Hemmstoff bzw. Angiotensinrezeptor-Typ1-Antagonist; ASS: Acetylsalicylsäure; CCS: Angina pectoris-Klassifikation der Canadian Cardiovascular Society; LHK EF: mittels Linksherzkatheter gemessene Ejektionsfraktion in %; NYHA: Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association

Nr.	Name	Alter	Pat.Nr.	OP-Datum	NYHA	LHK EF	CCS	Statin	ASS	ACE /AT1	β-Blocker
5	F.H.-J.	52	S2435228	09.01.2004	2	60%	2	0	0	0	Metoprolol
10	R.J.	65	S2328234	09.12.2003	2,5	55%	2,5	1	1	1	Metoprolol
13	H.G.	53	S2335480	01.12.2003	2	57%	2	1	0	1	Metoprolol
25	K.H.	73	S2443756	15.10.2004	2	62%	2	1	0	0	Carvedilol
31	K.A.	77	S2421669	24.09.2004	3	50%	2	1	1	1	Metoprolol
39	K.A.	76	S2419801	31.08.2004	1	74%	2	0	0	1	Bisoprolol
40	W.G.	65	S8638986	30.08.2004	2	55%	2	1	0	0	Metoprolol
45	K.K.-D.	58	S2441440	26.07.2004	3	63%	2	1	0	0	Metoprolol
52	W.H.	60	S2416648	20.04.2004	2	60%	2	1	1	1	Metoprolol
71	M.G.	75	S2407515	01.04.2004	2	49%	2	1	1	1	Metoprolol
78	R.B.	65	S2426687	23.11.2004	2	71%	3	0	1	1	Metoprolol
84	F.H.	56	S2428698	14.12.2004	2	65%	1,5	1	1	1	Metoprolol
88	P.P.	67	S2500505	11.01.2005	2	58%	2	1	1	1	Bisoprolol
90	B.M.	70	S2500674	12.01.2005	2	75%	2	1	1	1	Metoprolol
91	T.W.	78	S2535373	13.01.2005	2	55%	2	1	1	1	Metoprolol
92	W.H.	69	S2535548	19.01.2005	2	71%	2	0	1	1	Carvedilol
95	W.F.	57	S2501641	20.01.2005	2	76%	3	1	0	1	Metoprolol
107	H.A.	75	S2505549	07.03.2005	2	44%	2	1	1	1	Carvedilol
112	F.H.	69	S2506337	16.03.2005	2	72%	2	1	1	0	Bisoprolol
121	T.R.	48	S2509281	21.04.2005	2,5	55%	2	1	1	1	Metoprolol
125	B.H.-G.	75	S2509501	27.04.2005	2	75%	2,5	1	1	1	Metoprolol
128	T.W.	66	S2510230	02.05.2005	2	61%	4	1	0	0	Bisoprolol
132	B.R.	63	S2510820	12.05.2005	2	60%	2	1	1	0	Metoprolol
133	K.K.	51	S2511441	18.05.2005	2,5	65%	2	1	1	1	Bisoprolol

139	B.M.	63	S2539095	30.05.2005	2	70%	2	1	1	1	Metoprolol
140	P.H.-J.	77	S2539195	31.05.2005	2	65%	4	0	0	1	Metoprolol
150	E.H.	53	S2420187	08.09.2004	2	52%	2	1	1	1	Metoprolol
165	A.S.	73	S2517044	22.07.2005	2	60%	2	1	0	1	Metoprolol
167	L.I.	74	S8730720	25.07.2005	2,5	35%	2,5	1	1	1	Metoprolol
170	S.K.	70	S2521927	26.09.2005	3	58%	2	1	1	1	Metoprolol
174	H.R.	73	S2523420	25.10.2005	2	46%	2	1	0	0	Metoprolol
179	K.K.	79	S8780553	22.11.2005	2	62%	3	1	1	1	Carvedilol
190	R.E.	76	S2610035	07.04.2006	2	70%	2	1	1	1	Bisoprolol
239	B.K.-H.	81	S2612093	05.05.2006	2	60%	2	1	1	0	Bisoprolol
243	R.R.	80	S2625547	06.11.2006	1	71%	1	1	0	1	Metoprolol
246	S.G.	70	S2643821	01.11.2006	2	65%	3	1	1	0	Bisoprolol
255	B.A.	80	S2617808	21.07.2006	2	70%	3	0	1	1	Bisoprolol
269	K.H.	73	S2639870	20.06.2006	2	73%	2	1	1	1	Metoprolol
280	D.H-U.	53	S2029595	08.11.2000	2	72%	2	0	1	1	Metoprolol
287	IA.SI.	57	S2031343	29.11.2000	2	50%	3	1	1	1	Bisoprolol
290	R.D.	61	S2032808	11.12.2000	2	63%	2	0	1	1	Metoprolol
292	K.H.	70	S2034096	21.12.2000	2	74%	2	1	1	1	Metoprolol
293	Z.R.	60	S2034143	28.12.2000	2	80%	2	1	1	1	Bisoprolol
298	L.R.	57	S2102230	11.01.2001	2	67%	2	0	1	0	Bisoprolol
304	R.B.	56	S9913756	15.06.1999	2	58%	3	1	1	1	Metoprolol
305	V.W.	63	S9914415	26.05.1999	2	89%	2	1	0	1	Metoprolol
307	G.W.	71	S9913148	05.05.1999	2	66%	2,5	0	0	1	Metoprolol
314	Sch.V.	62	S9902407	26.01.1999	3	40%	2	1	0	1	Metoprolol
318	N.G.	68	S9908566	22.03.1999	2	35%	2	0	1	1	Metoprolol
323	P.E.	67	S9725299	11.09.1997	2	78%	2	0	1	0	Metoprolol
326	N.A.	60	S9726710	22.09.1997	1	78%	2,5	0	1	1	Bisoprolol
338	P.H.	85	S3363840	14.01.2008	1	60%	4	1	1	1	Metoprolol
339	M.H.	82	S3387188	18.02.2008	2	56%	2	0	1	1	Metoprolol

## 8.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 6:** Alphabetische Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen.

AP-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1,49 % (v/v) Triethanolamin pH 9,4
APS Stammlösung	10 % (w/v) APS in H <sub>2</sub> O
BCIP Stammlösung	5 % (w/v) BCIP in DMF bei -20°C dunkel lagern
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST pH 7,4 (evtl, Na-Azid zur Konservierung)
Elektrophoresepuffer	51,6 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Homogenisationspuffer	10 mM NaHCO <sub>3</sub> 5 % (w/v) SDS
NBT Stammlösung	5 % (w/v) NBT in 70 % DMF bei -20°C dunkel lagern
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 2 % (w/v) TCA
Porziopuffer (2x)	0,2 M Tris-Base 0,6 M Glycin 0,12 mM EDTA 0,2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 0,4 % (w/v) Polyacrylamid pH 8,8 (nicht einstellen)
Probenpuffer nach Lämmli (2x)	0,125 M Tris-Base 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,002 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8, Lagerung bei -20°C vor Gebrauch 6 mg DTT/ml zugeben
Sammelgel 4 %	4,7 ml Sammelgelpuffer 2,5 ml Rotiphorese Gel 30 11,6 ml H <sub>2</sub> O dest



	12 µl TEMED 190 µl APS Stammlösung
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8, Lagerung bei 4°C
Trenngel 10 %	37,5 ml Porziopuffer 2x 25 ml Rotiphorese Gel 30 6,25 ml Glycerin 6 ml H <sub>2</sub> O dest 65 µl TEMED 300 µl APS Stammlösung
TBST	10 mM Tris HCl pH 7,4 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH > 8, nicht einstellen!

### 8.3 Molekulargewichtsstandard

**Tabelle 7:** Markerproteine zur Größenbestimmung im Western Blot.

Molekulargewicht (kDa)	Protein (Bezugsquelle)	Eingesetzte Menge
96	Lipoxidase (SERVA Nr. 28021)	0,83 mg/ml
66	BSA (Sigma)	0,17 mg/ml
45	Ovalbumin (SERVA Nr. 11840)	0,25 mg/ml
29	Carboanhydrase (SERVA Nr. 15880)	0,17 mg/ml
26	Chymotrypsinogen A (SERVA Nr. 17200)	0,25 mg/ml
14	Ribonuclease A (SERVA Nr. 34388)	0,25 mg/ml
12,4	Cytochrom C (SERVA Nr. 18022)	0,25 mg/ml

In 1x Probenpuffer nach Lämmli mit 3 mg/ml DTT ansetzen und in 100 µl Aliquots bei -20°C lagern. Einsatz: 20 µl pro Gelspur.

## 8.4 Bezugsquellen

### 8.4.1 Chemikalien

Bezeichnung Hersteller bzw. Lieferant

APS Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

BCIP Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland (jetzt Thermo Scientific)

Bromophenolblau Sigma-Aldrich;

BSA Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

DMF Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA

DTT Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland

ECF Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg; Deutschland (jetzt GE Healthcare)

EDTA Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

Glycerin Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

Glycin Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

HCl Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

Magermilchpulver Lebensmittelhandel; Deutschland

NaCl AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

NaHCO<sub>3</sub> Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

NBT Fermentas GmbH; St. Leon-Rot; Deutschland (jetzt Thermo Scientific)

Nitrocellulosemembran Whatman GmbH; Dassel; Deutschland

Polyacrylamid Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

Ponceau S Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA

Rotiphorese® Gel 30 Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

SDS Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

TCA Sigma-Aldrich; St. Louis; MO; USA

TEMED SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland

Tris-Base Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

Triethanolamin Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

Tween 20 Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

### 8.4.2 Geräte

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Biometra Standard Power Pack P25	Biometra GmbH; Göttingen; Deutschland
Elektrophorese-Einheit Hoefer SE 600	Hoefer; San Francisco, CA; USA
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
ImageQuant®-Software	Molecular Dynamics; Sunnyvale; USA (jetzt GE Healthcare)
Horizontal-Schüttler 3015	GFL; Burgwedel; Deutschland
Mikro-Dismembrator S	Sartorius AG; Göttingen; Deutschland
PhosphorImager (STORM 860)	Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA; USA (jetzt GE Healthcare)
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Stromquelle Biorad Modell 200/2.0	Biorad; München; Deutschland
Tank-Transfer-Einheit Hoefer TE62	Hoefer; San Francisco, CA; USA
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD2070	Bandelin; Berlin; Deutschland

### 8.5 Antikörper

**Tabelle 9:** Für Immunoblots verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
anti CSQ2	gegen isoliertes kardiales Hunde-Calsequestrin, polyklonal, aus Kaninchen, affinitätsgereinigt	Acris Antibodies GmbH, Katalog Nr.: SP5340P (Mahony und Jones, 1986)
anti SERCA2a	gegen isolierte Hunde-SERCA2, monoklonal, aus Maus-Hybridomazellen	Briggs et al., 1992
anti PLB	gegen isoliertes Hunde-PLB, monoklonal, aus Maus-Hybridomazellen, Protein G-gereinigt	Badrilla, Leeds, UK, Katalog Nr.: A010-14 (Suzuki und Wang, 1986)

anti mouse	gegen Maus IgG, IgA, IgM, AP-konjugiert, polyklonal, aus Ziege, affinitätsgereinigt	Sigma, Katalog Nr.: A0162
anti rabbit	gegen Kaninchen IgG, AP-konjugiert, polyklonal, aus Ziege, affinitätsgereinigt	Sigma, Katalog Nr.: A3687

---

## **9 Thesen**

1. Calsequestrin 2, SERCA2a und Phospholamban sind Proteine des Calciumstoffwechsels, die sowohl in der Herzmuskulatur, als auch in der Skelettmuskulatur vorkommen und essentiell für Kontraktionsfähigkeit der Muskelfasern sind.
2. Calsequestrin 2, SERCA2a und Phospholamban sind Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums und sind im menschlichen Herzvorhofgewebe mit dem Western Blot-Verfahren nachweisbar.
3. Die Expression von SERCA2a korreliert mit der Expression von Phospholamban als physiologische Gegenspieler im Calciumkreislauf der Herzmuskelzelle.
4. Es besteht keine lineare Korrelation für Calsequestrin 2, SERCA2a und Phospholamban in Abhängigkeit vom Alter.
5. Die exprimierte Proteinmenge von Calsequestrin 2, SERCA2a und Phospholamban variiert interindividuell.
6. Die Einnahme von Acetylsalicylsäure vermindert die Expression von Phospholamban.
7. Das Wissen um die molekularen Ursachen der Herzinsuffizienz, insbesondere den gestörten Calciumstoffwechsel, könnte einen Behandlungsansatz für eine Gentherapie ergeben.

## **10 Lebenslauf**

Vor- und Zuname Frank Langguth  
Geburtsdatum 04.03.1965  
Geburtsort Halle/S

### **Schulbildung**

1971-1979 Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt  
1979-1983 Erweiterte Oberschule Halle-Neustadt  
1983 Abitur

1983-1985 Pflegerische Hilfskraft Chirurgische OP-Säle  
Bezirkskrankenhaus Halle-Dörlau

### **Studium**

1985 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1987 Physikum  
1990 - 1991 Pflichtassistenz Kreiskrankenhaus Weißenfels  
1990 Staatsexamen  
1991 Medizinisches Kolloquium und Erteilung der Approbation

### **Beruf**

1991-1993 Arbeit als Arzt im Praktikum in Weiterbildung zum Arzt für  
Innere Medizin Klinik am Kurpark Bad Salzuflen  
CA Prof. Dr. med. Mönninghoff  
1993-1994 Grundwehrdienst als Stabsarzt Bundeswehr in  
Holzminden  
1994-1995 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Arzt für Innere  
Medizin  
St. Bernhard-Hospital Kamp-Lintfort  
CA Dr.med. Kirschke  
1995-1999 Assistenzarzt in Weiterbildung zum  
Arzt für Innere Medizin  
Klinikum Lippe-Lemgo  
CA Dr.med. Alswede  
1999 Facharzt für Innere Medizin Münster/Westfalen

1999-2005	Hausärztlicher Internist in eigener Niederlassung Gemeinde Kalletal
2005-2006	Facharzt in Weiterbildung für Diabetologie Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara Halle CA Prof. Dr. med. Willenbrock
2006-2008	Mitarbeit in Anstellung in diabetologischer Schwerpunktpraxis Dr.med. R.-D. Langguth
2008	Erlangung der Zusatzbezeichnung Diabetologie
2008-dato	Hausärztlicher Internist und Diabetologe in eigener Niederlassung. Diabetologische Schwerpunktpraxis und Fußambulanz Halle

### **Doktorarbeit**

August 2007	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie bei Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Halle Thema: Altersabhängige Expression Ca <sup>2+</sup> -regulierender Proteine im menschlichen Herzvorhof
-------------	---

## **11 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel:

### **Altersabhängige Expression Ca<sup>2+</sup>-regulierender Proteine im menschlichen Herzvorhof**

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt habe und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet habe, sowie keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Halle (Saale), den 12.09.2015

Frank Langguth



## **12 Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Frank Langguth, keine weiteren Promotionsversuche unternommen zu haben.

Halle (Saale), den 12.09.2015

Frank Langguth

### **13 Danksagung**

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Dr. rer. nat. U. Gergs für die interessante Aufgabenstellung, die stetigen Anregungen, die intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit und die Geduld über die letzten sieben Jahre,

Frau Simmrodt und allen nicht namentlichen genannten Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg für die stetige Hilfsbereitschaft,

meiner Mutter, Frau Lore Maaß, die mich immer gefragt hat, ob ich noch an meiner Dissertation arbeite,

meiner Mitdotorandin Frau Winnie Mangold für die freundschaftliche Zusammenarbeit,

und meiner Kollegin und Freundin Frau Dr. med. Juliane Wünsche, der ich den Anstoß zur Suche nach einem Thema für eine Promotion verdanke.